



**Comparación de la especificidad y  
capacidad neutralizante de dos  
antivenenos antiofídicos retados con  
veneno de serpiente del género *Bothrops*  
de Colombia**

**Karen Solanyi Sarmiento Acuña**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá, Colombia  
2020



# **Comparación de la especificidad y capacidad neutralizante de dos antivenenos antiofídicos retados con veneno de serpiente del género *Bothrops* de Colombia**

**Karen Solanyi Sarmiento Acuña**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magíster en Toxicología**

Director (a):

M.Sc Toxicología, QF. Ana Lucía Castiblanco Rodríguez

Codirector (a):

Ph.D Toxicología, MD. Alejandro Alagón Cano

Línea de Investigación: Toxinología

Grupo de Investigación: Toxicología Ambiental y Ocupacional TOXICAO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2020



*Dedicado a mi adorada hija y esposo*



## **Agradecimientos**

A la Dra Ana Lucía Castiblanco por su apoyo incondicional, por creer en mis ideas y darme la confianza que necesitaba para desarrollar la investigación. Por todas sus enseñanzas, gestión, colaboración y paciencia en el laboratorio del IBUN, pero sobre todo por brindarme su amistad y las palabras de apoyo en los momentos difíciles.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por brindarme todo su apoyo desde que era estudiante de Medicina. Por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme con paciencia las técnicas que necesito aprender. Por su gentil amistad y confianza en todos los proyectos.

A la Maestría en Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia, a todo el equipo de docentes y administrativos, al profesor William Quevedo quien me asesoró oportunamente y a Carolina Piñeros por su amistad y gestión administrativa.

A la Dra. Alba Rodríguez por su apoyo moral, académico y logístico para aplicar a las convocatorias de la universidad en la movilidad a México y Argentina durante la maestría.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindarme el soporte logístico requerido para el desarrollo de la investigación.

A todo el equipo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, liderado por el Dr. Alejandro Alagón, por sus enseñanzas, apoyo, recomendaciones y paciencia al guiarme en el trabajo de laboratorio.

A Alejandro Olvera, Felipe Olvera, Ricardo Mondragón, Hilda Vázquez y Angelica Linares por el soporte académico, logístico y su amistad.

A Melisa Benard, Edgar Neri, Irving Archundia, Belem García y Julia Quiroz por todo su apoyo, sus enseñanzas, buenos consejos, orientaciones, guía académica y los lazos de amistad que no han decaído con el tiempo.

A la Pontificia Universidad Javeriana quien me ha brindado la oportunidad para crecer en mi formación profesional como Médica investigadora y Magíster en Toxicología.

A la Dra María Jose Fernández por su apoyo incondicional como líder del Departamento, por escucharme y tenerme paciencia. Por toda su colaboración para hacer posibles mis metas.

Al Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, a mis amigos Andres Bedoya, Gina Rojas y Sirley Rodríguez por escucharme. A mis compañeros de trabajo por su colaboración y brindarme apoyo moral.

A Carlos Galvis y la Fundación Zoológica de Cali, por facilitarme la adquisición del veneno de *Bothrops rhombeatus* y los convenios generados para futuras investigaciones.

A mis hermanas de maestría Alejandra Ramírez, Marisol Villadiego, Elizabeth Arteaga y Lucía Toscano por ofrecer esa voz de aliento siempre que se necesita, por brindarme una amistad sincera.

Agradecimiento especial a mi hija Lina Sofía Zambrano y mi esposo Jorge Zambrano por su apoyo y paciencia en mis largas jornadas de trabajo. Por su amor incondicional: a mis padres María de Jesus Acuña y Luis Carlos Sarmiento, a mi tía María de Carmen Acuña, a mi hermanita Liceth Sarmiento y mis sobrinas Paula y Juanita Méndez.



## Resumen

**Introducción.** En Colombia se comercializa el antiveneno antiofídico polivalente del Instituto Nacional de Salud (INS) y el antiveneno del Instituto Bioclon, perteneciente a Laboratorios Silanes de México, denominado Antivipmyn-Tri (AVP-T), siendo relevante que ninguno incluye para su elaboración el veneno de la especie *Bothrops rhombeatus*.

**Objetivo.** El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad neutralizante, especificidad y afinidad de los antivenenos INS y AVP-T al veneno de *Bothrops rhombeatus*, utilizando como referente y control para los experimentos el veneno de *Bothrops asper* y de *Bothrops atrox*. **Métodos.** La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Instrumental del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia y en Laboratorio de Análisis de Toxinas del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ensayos con murinos se realizaron con ratones albinos *Mus musculus* CD1 con peso entre 18-20 g, por vía intraperitoneal (IP). Se cuantificaron las proteínas del veneno y los antivenenos por Absorbancia a 280 nm, método de Bradford y Ácido Bicinconínico (BCA). Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Duodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para analizar el perfil proteico. Se calculó la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) del veneno y la Dosis Efectiva Media (DE<sub>50</sub>) de los antivenenos. Se evaluó la especificidad y afinidad inmunoquímica de los antivenenos hacia el veneno con cromatografía de afinidad, Western Blot, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y SDS-PAGE de las fracciones acopladas a cada uno de los antivenenos. **Resultados.** Dentro de los resultados se encontró una DL<sub>50</sub> para el veneno de *B. rhombeatus* de 6.6 mg/kg, para *B. asper* fue de 6.4 mg/kg y para *B. atrox* de 6.7 mg/kg. La DE<sub>50</sub> para INS fue de 119.7 µg/3DL<sub>50</sub> y para AVP-T de 270.2 µg/3DL<sub>50</sub> con el veneno de *B. rhombeatus*. Comparado con el veneno de *B. asper* la DE<sub>50</sub> para INS fue de 62,74 µg/3DL<sub>50</sub>, para AVP-T de 143,8 µg/3DL<sub>50</sub>, mientras que con el veneno de *B. atrox* DE<sub>50</sub> para INS fue de 75,15 µg/3DL<sub>50</sub> y para AVP-T de 190,2 µg/3DL<sub>50</sub>.

Se correlacionó el perfil electroforético y las fracciones del cromatograma del veneno sugiriendo en el veneno de *B. rhombeatus* la presencia de fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Metaloproteinasas (svMP) tipo I, II y III y serinoproteasas (SP). Se encontraron similitudes entre los perfiles de los venenos de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*, de los componentes proteicos de alto, medio y bajo peso molecular con bandas entre 50-70 KDa correspondientes a svMP III, bandas alrededor de 20-25 KDa de svMP I y bandas entre 11-15 KDa de PLA<sub>2</sub>. Se encontró que ambos antivenenos mostraron reconocimiento inmunoquímico hacia PLA<sub>2</sub> y svMP pero en diferente intensidad. El antiveneno INS mostró reconocimiento de las fracciones de svMP III del veneno de *B. atrox*; al igual que hacia svMP I y III del veneno de *B. rhombeatus* y las fracciones svMP I, II y III del veneno de *B. asper*. A diferencia del INS, AVP-T si presentó reconocimiento inmunoquímico a SP del veneno de *B. rhombeatus* y a casi todas las fracciones de svMP del veneno de *B. asper*, mostrando mayor intensidad a svMP III y PLA<sub>2</sub> del veneno de *B. atrox*. La cuantificación de anticuerpos específicos del INS acoplados al veneno de *B. rhombeatus* fue de 94,2%; hacia el veneno de *B. asper* fue de 92,7%; mientras que AVP-T tuvo un acoplamiento del 90,4% hacia *B. rhombeatus* y de 96,6% al veneno de *B. asper*. Estos datos son concordantes con la capacidad neutralizante, donde AVP-T fue tan eficaz como INS para neutralizar la letalidad del veneno de *B. rhombeatus*, sin embargo, cabe resaltar que ninguno fue desarrollado con este veneno, por lo que se infiere una reactividad cruzada hacia PLA<sub>2</sub> y svMP. Todo lo anterior fue corroborado con el nivel de reconocimiento de la prueba ELISA, donde se evidenció que se requirió más antiveneno INS para alcanzar la mitad de la respuesta máxima con el veneno de *B. rhombeatus* comparado con AVP-T.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos sugieren que ambos antivenenos pueden ser una opción terapéutica para tratar los envenenamientos causados por esta especie, sin embargo, más allá, está el hecho de comprender que es necesario mejorar la especificidad de los antivenenos comerciales, para que sean más afines a las fracciones de los venenos con efecto significativo en la fisiopatología del paciente, lo que permitiría neutralizar más fácilmente la ofidiotoxicosis sin requerir una gran cantidad de antiveneno y disminuir las reacciones secundarias al exceso de inmunoglobulinas heterólogas en plasma.

**Palabras clave:** *Bothrops rhombeatus*, *Bothrops asper*, Antivenenos antiofídicos, Instituto Nacional de Salud, Instituto Bioclón, Antivipmyn-Tri, mordedura de serpiente.

## Abstract

**Introduction.** In Colombia the antivenom against snakebite from the National Institute of Health (INS) and the antivenom from the Bioclon Intitute, belonging to Laboratorios Silane of Mexico, Antivipmyn-Tri (AVP-T), but neither includes venom of *Bothrops rhombeatus* species for their production. **Objective.** The aim of this research was to evaluate the neutralizing capacity, specificity and affinity of INS and AVP-T antivenoms with *B. rhombeatus* venom, using the *Bothrops asper* and *Bothrops atrox* venom as a reference and control for the experiments. **Methods.** The research was carried out in the Instrumental Analysis Laboratory of the Institute of Biotechnology of the Universidad Nacional de Colombia, and in the Toxins Analysis Laboratory of the Institute of Biotechnology of the Universidad Nacional Autónoma de México. The test in mice were analyzed with albinos *Mus musculus* CD1 weighing between 18-20 g intraperitoneally (IP). Venom proteins and antivenoms were quantified by Absorbance 280 nm, Bradford method and Bicinchoninic acid (BCA). Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) to analyze the protein profile. The mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the venom and the mean effective dose (ED<sub>50</sub>) of the antivenoms were calculate. The immunochemical specificity and affinity of the antivenoms for the venom were evaluated with affinity chromatography, Western Blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and SDS-PAGE of the fractions coupled to each antivenoms. **Results.** The *B. rhombeatus*'s LD<sub>50</sub> was 6,6 mg/kg, of *B. asper* was 6,4 mg/kg and of *B. atrox* was 6,7 mg/kg. The INS's ED<sub>50</sub> was 119,7 µg/3LD<sub>50</sub> and AVP-T's ED<sub>50</sub> was 270 µg/3LD<sub>50</sub> with *B. rhombeatus* venom. Compared with *B. asper* venom, the INS's ED<sub>50</sub> was 62,74 µg/3LD<sub>50</sub> and AVP-T's ED<sub>50</sub> was 143,8 µg/3LD<sub>50</sub>, and with *B. atrox* venom the INS's ED<sub>50</sub> was 75,15 µg/3LD<sub>50</sub> and AVP-T's ED<sub>50</sub> was 190,2 µg/3LD<sub>50</sub>. The electrophoretic profile and the chromatogram fractions of the venom was correlated, suggesting phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>), metalloproteinases (svMP) type I, II, III and serinoproteases (SP) in *B. rhombeatus* venom. Similarities of high, medium and low molecular weight protein were found between the profile of the three venoms with bands between 50-70 KDa corresponding to svMP III, band around 20-25 KDa of svMP I and between 11-15 KDa of PLA<sub>2</sub>. Both antivenoms showed

immunochemical recognition towards PLA<sub>2</sub> and svMP but at different intensity. INS showed recognition to svMP III fractions of *B. atrox* venom, same as towards svMP I and III of *B. rhombeatus* venom and svMP I, II and III fractions of the *B. asper* venom. Unlike INS, AVP-T showed immunochemical recognition to SP of *B. rhombeatus* venom and almost all the svMP fractions of *B. asper* venom, with higher intensity to svMP III and PLA<sub>2</sub> of *B. atrox* venom. The quantification of antibodies coupled was for INS to *B. rhombeatus* was 94,2% and to *B. asper* venom was 92,7%; while AVP-T had 90,4% coupling to *B. rhombeatus* and 96,6% to *B. asper* venom. These results are consistent with the ED<sub>50</sub>, because both antivenoms were effective to neutralize the lethality of the *B. rhombeatus* venom, however, considering neither was developed with this venom, thus inferring cross-reactivity towards PLA<sub>2</sub> and svMP. All the above, were corroborated with the recognition level of the ELISA test, which it is evident that more INS antivenom was required to reach half of the maximum response with the *B. rhombeatus* venom compared to AVP-T.

**Conclusion.** The results obtained suggest that both antivenoms may be a therapeutic option to the treatment of snakebite caused by *B. rhombeatus*, however, beyond that there is the fact is necessary to improve the specificity of commercial antivenoms, so that they are more related to the venom's fractions with a significant effect on the pathophysiology of the patient, which would allow ophidiotoxicosis to be more easily neutralized without requiring a large amount of antivenoms and reducing secondary reactions to excess heterologous plasma immunoglobulins.

**Keywords:** *Bothrops rhombeatus*, *Bothrops asper*, Antivenoms, National Institute of Health, Bioclón Institute, Antivipmyn-Tri, snakebite.

# Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XVI
Lista de tablas.....	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVIII
Introducción.....	1
1. Objetivos.....	5
1.1 Objetivo general .....	5
1.2 Objetivos específicos.....	5
2. Marco teórico .....	7
2.1 Distribución de las serpientes venenosas en Colombia .....	7
2.1.1 Familia <i>Elapidae</i> .....	7
2.1.2. Familia <i>Viperidae</i> .....	8
2.1.2.1. <i>Bothrops rhombeatus</i> .....	9
2.2 Componentes del veneno de serpiente .....	10
2.2.1 Proteínas del veneno de serpiente del género <i>Bothrops</i> .....	12
2.3 Mecanismos de toxicidad del veneno de serpiente.....	14
2.3.1 Toxicocinética.....	14
2.3.2 Toxicodinamia.....	14
2.3.2.1 Mecanismo de acción del veneno de serpientes de la familia <i>Viperidae</i> .....	14
2.4 Cuantificación proteica del veneno de serpiente.....	15
2.5 Separación de proteínas del veneno de serpiente.....	17
2.6 Evaluación de letalidad de los venenos de serpiente.....	18
2.6.1 Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ) .....	18
2.7 Afinidad inmunoquímica.....	18
2.8 Antivenenos antiofídicos.....	19
2.8.1 Diferencias entre los antivenenos antiofídicos.....	20
2.8.2 Antivenenos antiofídicos polivalentes en Colombia.....	21
2.8.3 Dosis efectiva Media (DE <sub>50</sub> ) .....	22
3. Metodología .....	23
3.1 Estrategia experimental .....	23
3.2 Lugar de experimentación.....	24
3.2.1 Laboratorio de Análisis instrumental del IBUN .....	24

3.2.2	Laboratorio de Análisis de Toxinas del IBT.....	24
3.3	Aprobación del comité de ética.....	24
3.4	Análisis estadístico.....	25
3.5	Animales de experimentación.....	25
3.6	Evaluación de los venenos.....	26
3.6.1	Origen del veneno.....	26
3.6.2	Cuantificación de proteínas del veneno de serpiente.....	27
3.6.2.1	Peso seco.....	27
3.6.2.2	Cuantificación por absorbancia 280 nm.....	27
3.6.2.3	Método del ácido bicinconínico BCA.....	28
3.6.2.4	Método de Bradford.....	28
3.6.3	Separación de proteínas del veneno de serpiente.....	29
3.6.3.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	29
3.6.3.2	Cromatografía líquida de alta resolución fase reversa.....	30
3.6.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones del veneno .....	31
3.6.4	Prueba de letalidad. ....	31
3.6.4.1	Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ) .....	31
3.7	Evaluación de los antivenenos antiofídicos utilizados.....	32
3.7.1	Origen de los antivenenos.....	32
3.7.2	Cuantificación de proteínas de los antivenenos.....	33
3.7.2.1	Cuantificación por Absorbancia 280nm.....	33
3.7.2.2	Método del ácido bicinconínico BCA.....	33
3.7.2.3	Método de Bradford.....	33
3.7.3	Separación de proteínas de los antivenenos.....	34
3.7.3.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	34
3.7.4	Prueba de neutralización.....	34
3.7.4.1	Dosis Efectiva Media (DE <sub>50</sub> ) .....	34
3.8	Afinidad inmunoquímica antiveneno- veneno de serpiente.....	35
3.8.1	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.....	35
3.8.2	Western Blot.....	35
3.8.3	Cromatografía de Afinidad.....	36
3.8.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones del veneno acopladas a los antivenenos.....	37
4.	Resultados y análisis .....	39
4.1	Cuantificación de proteína.....	39
4.1.1	Cuantificación proteica de los venenos .....	39
4.1.1.1	Absorbancia 280 nm.....	39
4.1.1.2	Método ácido bicinconínico BCA.....	41
4.1.1.3	Método de Bradford.....	41
4.1.2	Cuantificación proteica de los antivenenos.....	43
4.1.2.1	Absorbancia 280 nm .....	43
4.1.2.2	Método del ácido Bicinconínico BCA.....	43
4.1.2.3	Método de Bradford.....	43
4.2	Perfil electroforético de los venenos y antivenenos.....	45
4.3	Separación de las fracciones de los venenos .....	48
4.3.1	Cromatografía líquida de alta resolución den fase reversa.....	48
4.3.2	Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones del veneno.....	51
4.4	Afinidad inmunoquímica antiveneno - veneno.....	54
4.4.1	ELISA .....	54

---

4.4.2 Western Blot .....	57
4.4.3 Cromatografía de afinidad .....	59
4.4.4 Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones acopladas.....	60
4.5 Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ).....	63
4.6 Dosis Efectiva Media (DE <sub>50</sub> ).....	64
5. Conclusiones y recomendaciones .....	67
5.1 Conclusiones.....	67
5.2 Recomendaciones.....	69
5.3 Limitaciones.....	70
Anexos	
A. Anexo: Aprobación Comité de Bioética, Facultad Veterina y Zootecnia.....	72
B. Anexo: Certificación Curso Modelos Animales Experimentales. ....	73
C. Anexo: Método de Cuantificación de proteína por Absorbancia 280nm (IBT).....	74
D. Anexo: Método de Cuantificación de proteína por BCA (IBT).....	75
E. Anexo: Método de Cuantificación de proteína por Bradford (IBT).....	77
F. Anexo: Electroforesis en Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (IBT).....	78
G. Anexo: Electroforesis en Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (IBUN).....	81
H. Anexo: Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa (IBT).....	83
I. Anexo: Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa (IBUN).....	85
J. Anexo: Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ) .....	86
K. Anexo: Dosis Efectiva Media (DE <sub>50</sub> ) .....	87
L. Anexo: Inmunoensayo Indirecto ELISA (IBT).....	88
M. Anexo: Western Blot (IBT).....	90
N. Anexo: Cromatografía de Afinidad (IBT).....	92
Bibliografía .....	94

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Distribución de <i>Bothrops Rhombeatus</i> en Colombia y en el Cauca	9
Figura 2-2: Foto de <i>Bothrops rhombeatus</i> Fundación Zoológica de Cali	10
Figura 2-3: Esquema de inmunoglobulina IgG completa, F(ab') <sub>2</sub> y Fab	20
Figura 4-1: Curva de calibración Método BCA	41
Figura 4-2: Curva de calibración Método Bradford	42
Figura 4-3. Curva de calibración Bradford para los antivenenos	44
Figura 4-4: Electroforesis del veneno de <i>B. rhombeatus</i> y los antivenenos	46
Figura 4-5: Patrón electroforético <i>B. rhombeatus</i> , <i>B. asper</i> y <i>B. atrox</i>	47
Figura 4-6: Cromatograma del veneno completo de <i>Bothrops rhombeatus</i> , IBT	48
Figura 4-7: Cromatograma del veneno completo de <i>Bothrops rhombeatus</i> , IBUN	49
Figura 4-8: Cromatograma del veneno completo de <i>Bothrops asper</i> , IBT	49
Figura 4-9: Cromatograma del veneno completo de <i>Bothrops atrox</i> , IBT	50
Figura 4-10: Perfil cromatográfico de <i>B. asper</i> encontrado por Scovino	51
Figura 4-11: Curva de calibración de ELISA para cada antiveneno	54
Figura 4-12: Reconocimiento por ELISA del INS y AVP-T hacia los venenos	55
Figura 4-13: Reconocimiento por Western Blot del INS y AVP-T hacia los venenos	58
Figura 4-14: Electroforesis de las fracciones Ag-Ac acopladas	61
Figura 4-15: Curva dosis respuesta DL <sub>50</sub> Intraperitoneal <i>B. rhombeatus</i>	63
Figura 4-16: DE <sub>50</sub> Intraperitoneal de INS y AVP-T para la especie <i>B. rhombeatus</i>	64



## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Actividad de algunos péptidos del veneno de serpiente	11
Tabla 2-2. Componentes del veneno de <i>Bothrops asper</i>	12
Tabla 2-3. Comparación de diferentes métodos de cuantificación de proteína	16
Tabla 3-1. Fase experimental para la comparación de los antivenenos	23
Tabla 4-1: Peso en seco y concentración inicial de los venenos	39
Tabla 4-2: Cuantificación de proteína del veneno <i>B. rhombeatus</i> con Nanodrop®	40
Tabla 4-3: Cuantificación de proteína de los venenos mediante Abs 280	40
Tabla 4-4: Proteína promedio calculada para los venenos por diferentes métodos	42
Tabla 4-5: ANOVA para los métodos de cuantificación de proteína de los venenos	43
Tabla 4-6: Cuantificación de proteína de los antivenenos por diferentes métodos	44
Tabla 4-7: ANOVA para los métodos de cuantificación de proteína de antivenenos	45
Tabla 4-8: Compuestos posibles de las fracciones según el tiempo de elución	48
Tabla 4-9: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de <i>B rhombeatus</i>	53
Tabla 4-10: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de <i>B atrox</i>	53
Tabla 4-11: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de <i>B asper</i>	54
Tabla 4-12. Reconocimiento por ELISA del INS y AVP-T hacia los venenos	55
Tabla 4-13: ANOVA para los resultados de ELISA de los antivenenos	57
Tabla 4-14: Cuantificación del acoplamiento del INS y AVP-T hacia los venenos	60
Tabla 4-15: Asociación posible reconocimiento inmunoquímico de los antivenenos	62
Tabla 4-16: Comparación de DL <sub>50</sub> de los venenos	63
Tabla 4-17. Dosis efectiva de INS y AVP-T para los diferentes venenos	65

## Lista de Símbolos y abreviaturas

°C	Grados centígrados
%	Porcentaje
3DL <sub>50</sub>	3 Dosis letales medias
3FTx	Toxinas de 3 dedos
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
AChE	Acetilcolinesterasa
ASB	Albúmina Sérica Bovina
AVP-T	Antiveneno Antivipmyn-Tri (Bioclon,México)
BCA	Ácido bicinconínico
CID	Coagulación intravascular diseminada
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CNBr	Bromuro de cianógeno
CRISP	Proteínas secretoras ricas en Cisteína
CTL	Lectinas tipo C
Cu <sup>+1</sup>	Ión cuproso
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
Fab	Fragmento de unión a antígeno
F(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de unión a antígeno

---

Fc	Fracción cristalizable
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
FPLC	Cromatografía líquida de alta velocidad
FZC	Fundación Zoológica de Cali
g	Gramos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
h	hora
HPLC	Cromatografía Líquida de alta Resolución
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
IBUN	Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia
IBT	Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma México
ICP	Instituto Clodomiro Picado
CD1	Tipo de cepa de ratones
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IM	Intramuscular
INS	Antiveneno del Instituto Nacional de Salud de Colombia
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
KDa	Kilo Daltones
KUN	Péptidos Inhibidores de proteasas tipo Kunitz
LAAO	L-amino ácido oxidasa
min	Minuto
mg	Miligramo

mgAv/mgV	Miligramos de antiveneno necesarios para neutralizar 1 miligramo de veneno
mL	Mililitro
μg	Microgramo
μl	Microlitro
MPM	Marcadores de peso molecular
svMP	Metaloproteasas
MS	Espectrofotometría de masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mV	Milivoltios
MVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
nm	Nanómetro
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
NNTRC	National Natural Toxin Research Center
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrogeniones
PSA	Persulfato de amonio
PBS	Amortiguador de fosfatos con salina
PDE	Fosfodiesterasa
PLA	Fosfolipasa
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PUJ	Pontificia Universidad Javeriana

---

RAM	Reacción Adversa a Medicamento
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa
rpm	Revoluciones por minuto
R <sup>2</sup>	R cuadrado.
SC	Subcutáneo
seg	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de poliacrilamida en presencia de Duodecil-sulfato sódico
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia en Salud Pública
SIn	Solución
SP	Serinoproteinasas
ST	Estándares
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
UN	Universidad Nacional de Colombia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
V	Voltios
Vd	Volumen de distribución
v/v	Volumen/volumen
p/v	Peso/volumen



# Introducción

Colombia ocupa el tercer lugar en biodiversidad ofídica en América (1) lo que aumenta la posibilidad de encuentro entre humanos y serpientes, lo que genera como consecuencia un aumento del riesgo para presentar accidentes ofídicos. En Colombia se encuentran 2 familias de serpientes venenosas de importancia médica, la familia *Viperidae*, conteniendo los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothropsis*, *Porthidium*, *Lachesis* y *Crotalus*; mientras que la familia *Elapidae* incluye para Colombia un mínimo de 29 especies de serpientes del género *Micrurus* conocidas como corales verdaderas (1).

Los venenos de las serpientes son mezclas de sustancias proteicas y no proteicas, las cuales solas o en conjunto pueden causar efectos tóxicos en diferentes especies animales (2). El veneno es elaborado a partir de diferentes factores ambientales y propios del animal, asimismo puede variar en distintos individuos de la misma especie debido a factores como la edad y localidad geográfica, además de los factores ontogénicos (3). Dependiendo de la toxicocinética y toxicodinamia, un veneno con varios grupos de toxinas puede tener efecto a nivel miotóxico, miolítico, hemorrágico, procoagulante y hematotóxico (2–5), entre muchos, como es el caso del veneno de la familia *Viperidae* (6,7), mientras que existe otro tipo de veneno con varios grupos de toxinas neurotóxicas que afectan a nivel pre y postsináptico en la placa neuromuscular, como ocurre con el veneno de la familia *Elapidae* (8–10), siendo ambos tipos de venenos altamente tóxicos y mortales para los humanos.

El ofidismo o mordedura de serpiente es considerado un problema de salud pública y su notificación es obligatoria en Colombia desde el año 2004 (11). Para el 2019 se reportaron 5.147 casos confirmados por clínica, con 2,6% más respecto al año anterior, con una incidencia nacional de 10,2/100.000 habitantes para ese mismo año (12). Aproximadamente el 64% fueron causados por serpientes de la familia *Viperidae* y 1,1% por la familia *Elapidae*.

De los casos reportados para el 2.019 se excluyeron 523 casos al ser confirmados finalmente como No envenenamiento, para un total de 4.624 casos, de los cuales solo el 79% (3.654) recibieron tratamiento con antiveneno sin embargo, en el correspondiente boletín epidemiológico (12) no se aclara la causa por la cual no todo los casos recibieron antiveneno.

El género *Bothrops sp.* está conformado por 37 especies distribuidas desde México hasta Argentina, tiene una gran importancia médica debido a que ocasionan la mayor parte de los accidentes ofídicos en ese territorio y su veneno tiene diversos componentes los cuales causan un cuadro clínico complejo de severidad variable dependiendo de la cantidad de veneno inoculado, dentro del cual sobresale el marcado y progresivo deterioro del estado hemodinámico, con hemólisis generalizada, consumo de los factores de coagulación, miotoxicidad, necrosis distal en miembros superiores y/o inferiores, complicaciones a nivel de la microvasculatura cardiovascular y renal principalmente, coagulación intravascular diseminada y choque distributivo (13–15).

La mayoría de los accidentes en Colombia se registran bajo el nombre de *Bothrops asper* debido a que es la especie más frecuentemente nombrada, cuando en realidad debido a su distribución en Colombia pueden ser dos o más especies con características morfológicas similares, sobre todo en la región del pacífico de Colombia, donde se encuentra *Bothrops rhombeatus* (16) y dado que no se conoce un aproximado de la caracterización proteica del veneno de *B. rhombeatus*, no se puede predecir la similitud o variación en la presentación del cuadro clínico o su severidad.

Los antivenenos antiofídicos son la terapia específica para el tratamiento del accidente ofídico o mordedura de serpiente (17). Éstos pueden definirse como productos biológicos que son obtenidos a través de la inducción de inmunidad adaptativa en un animal hospedero, de donde se extraen anticuerpos específicos una vez finalizado un esquema de inmunización.

En Colombia se elaboran antivenenos antiofídicos compuestos por inmunoglobulinas completas purificadas (18) conocidos comercialmente como sueros antiofídicos, sin embargo, debido a la limitada producción de este antiveneno por el Instituto Nacional de Salud, permanentemente hay desabastecimiento del producto. Por esta razón se declaró en el 2.010 el estado de emergencia sanitaria (19,20) el cual ha permitido clasificar al



antiveneno como un medicamento esencial con la consecuente importación de antivenenos de tercera generación conocidos como faboterápicos.

Los antivenenos faboterápicos están compuestos a partir de las fracciones de unión a antígeno (Fab o  $F(ab')_2$ ) de las inmunoglobulinas (21). Los antivenenos comercializados en Colombia provienen del ente público correspondiente al Instituto Nacional de Salud, antiveneno que en este documento se denominará INS y de las entidades privadas se destaca Bioclón, empresa mexicana que produce el antiveneno Antivipmyn-Tri (AVP-T). Los antivenenos mencionados son polivalentes para la familia *Viperidae* los cuales difieren en su elaboración teniendo en cuenta el proceso de producción de las inmunoglobulinas, siendo INS una mezcla de inmunoglobulinas completas purificadas heterólogas y AVP-T compuesto por  $F(ab')_2$  purificadas heterólogas, elaborados con venenos de diferentes regiones (México y Colombia). Los dos antivenenos mencionados anteriormente no indican en el inserto las especies de serpiente con las cuales ha sido elaborado el producto, pero si describen una cantidad aproximada de veneno que neutraliza para un género de serpientes, incitando a pensar que neutraliza la misma cantidad de veneno para todas las especies de ese género.

A través del tiempo y la evolución de los antivenenos, se han generado nuevos métodos de producción, purificación y separación, que han permitido perfeccionar las inmunoglobulinas de estos medicamentos, así como aumentar la especificidad de los antivenenos polivalentes y disminuir el número de viales utilizados durante el tratamiento, con la consecuente disminución de Reacciones Adversas al Medicamento (RAM) (22–24). Sin embargo, el método de valoración de la capacidad neutralizante, considerado uno de los parámetros fundamentales para corroborar la efectividad del producto, ha permanecido estable, a pesar de los avances, por lo tanto, se considera de gran importancia identificar la razón por la cual la capacidad neutralizante no varía significativamente, a pesar de las diferencias en la especificidad de las inmunoglobulinas. Para ello, se realizó un estudio comparativo entre dos antivenenos polivalentes para familia *Viperidae*, con fracciones de inmunoglobulinas diferentes debido a su método de producción, evaluando su capacidad neutralizante y reconocimiento inmunoquímico hacia el veneno de *Bothrops rhombeatus* de Colombia, con el fin reconocer la importancia de la especificidad en la elaboración de los antivenenos y su relación con la capacidad neutralizante e identificar si realmente se puede equiparar la neutralización de todo un género como lo describen los antivenenos actualmente en el inserto (25–28).



# 1.Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad neutralizante y los niveles de reconocimiento inmunoquímico de los antivenenos polivalentes del Instituto Nacional de Salud (INS<sup>1</sup>) y Antivipmyn-Tri (AVP-T<sup>2</sup>) hacia los componentes del veneno de la especie *Bothrops rhombeatus* de la ecorregión Andina de Colombia.

## 1.2 Objetivos específicos

- Identificar de manera preliminar la composición proteica del veneno de la serpiente *Bothrops rhombeatus* de la ecorregión Andina de Colombia
- Determinar la concentración proteica de los antivenenos INS y AVP-T.
- Determinar la letalidad del veneno de serpiente de la *B. rhombeatus* de la ecorregión Andina de Colombia
- Ponderar la efectividad de los antivenenos INS y AVP-T en términos de su capacidad para neutralizar la letalidad del veneno de *B. rhombeatus*.
- Establecer el reconocimiento inmunoquímico preliminar de los diferentes componentes proteicos del veneno de *B. rhombeatus* de la ecorregión Andina de Colombia por los antivenenos INS y AVP-T.

<sup>1</sup>.INS: Antiveneno producido por el Instituto Nacional de Salud, Colombia

<sup>2</sup>.AVP-T: Antiveneno Anvipmyn producido por el Instituto Bioclón, México.



## 2.Marco teórico

### 2.1 Distribución de serpientes venenosas en Colombia

En Colombia se puede observar que a medida que disminuye la altitud en las diferentes cordilleras del país, la variedad y cantidad de serpientes aumenta, de esta manera hay regiones del país con un mínimo de serpientes como lo son las aguas del mar caribe, páramos y súper-páramos por encima de 3.500 msnm. En general, sumando los territorios superiores a 1.500 msnm de la ecorregión andina se pueden encontrar alrededor de 51 especies, de las cuales máximo 3 especies son venenosas (1). La Amazonía y el Chocó biogeográfico contienen la mayor diversidad de serpientes del país, al igual que las zonas con altura inferior a los 100 msnm de los valles interandinos y la ecorregión caribe, conteniendo entre 45 a 46 especies de serpientes, no obstante, la mayoría de las especies venenosas están distribuidas entre la familia *Viperidae* y las corales (12).

#### 2.1.1 Familia *Elapidae*

De esta familia, las corales verdaderas presentan una amplia distribución en Colombia con cerca de 29 especies de serpientes (1,29). A nivel epidemiológico se destacan por su frecuencia de accidentalidad las especies de hábitos acuáticos como *Micrurus nattereri* y *Micrurus surinamensis* al oriente de los Andes; La coral rabo de ají o *Micrurus mipartitus* asociada con alta accidentalidad en la zona cafetera (30); En la zona boscosa de los Andes se destacan las especies del género *Leptomicrurus* y La especie *Pelamis platurus* se le encuentra exclusivamente en el mar Pacífico (1).

### 2.1.2 Familia *Viperidae*

En cuanto a la distribución, las serpientes de la familia *Viperidae* se encuentran en todas las ecorregiones del país por debajo de los 2.600 msnm. La especie *Bothriechis schlegellii*, representante del género *Bothriechis* en el país está distribuida en la zona cafetera, el bajo Chocó biogeográfico sobre la vertiente occidental de las cordilleras occidental y central, además de la vertiente occidental de la cordillera oriental (6), encontrándose desde 0 – 2.640 msnm (30,31). Las especies *Bothriopsis bilineata*, *Bothriopsis taeniata* y *Bothriopsis pulchra*, son representativas del género *Bothriopsis* en Colombia y se distribuyen principalmente en el bosque húmedo al oriente de los Andes (1). Del género *Bothrocophias*, la especie *Bothrocophias hyporora* se encuentra en la Amazonía, mientras que *Bothrocophias myersi* en los bosques húmedos del Chocó biogeográfico (32) y *Bothrocophias microptahalmus* se encuentra principalmente al flanco oriental de los Andes hasta los 2.600 msnm (30).

El género *Bothrops* tiene una amplia distribución encontrándose a *Bothrops asper* principalmente al occidente de la cordillera oriental, mientras que *Bothrops atrox* al oriente de los Andes (1,15,33). La especie *Bothrops rhombeatus* se encuentra distribuida en la región del Valle del Cauca (34), sin embargo, se desconoce a nivel epidemiológico la frecuencia de accidentalidad por esta especie. Además, de este género se encuentra *Bothrops brasili* en la Amazonía y *Bothrops punctatus* en el Chocó biogeográfico. Este género *Bothrops* sobresale en el país por su alta frecuencia de accidentalidad en todas las regiones con cerca del 80% de los casos en Colombia (35).

7

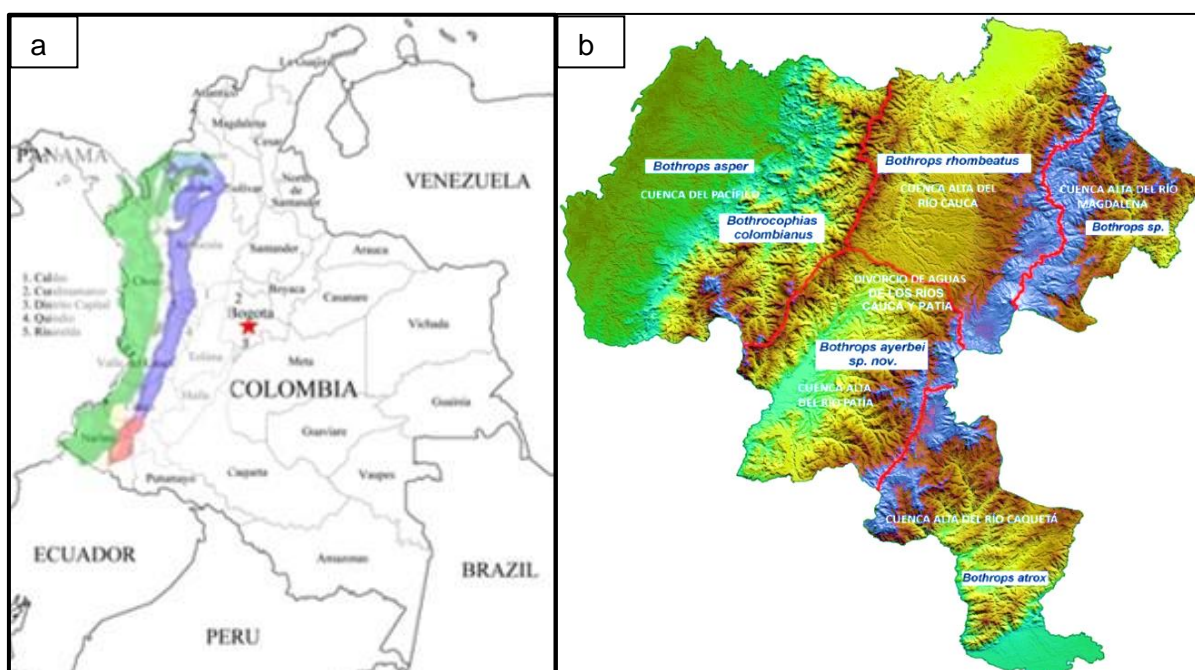
Del género *Crotalus* el representante en Colombia es la serpiente de cascabel *Crotalus durissus*, ubicada en las zonas secas del país; Se ha observado en la cuenca alta del río Magdalena, al oriente de los Andes, en los llanos orientales y en la ecorregión Caribe del país (36,37). El género *Porthidium* en Colombia está representado por dos especies, *Porthidium lansbergi* distribuida sobre la costa Caribe y los valles interandinos, desde zonas secas hasta bosque seco tropical y la especie *Porthidium nasutum* ubicada en el bosque húmedo del Chocó biogeográfico (6,33). Del género *Lachesis* hay dos especies en Colombia, *Lachesis muta* ubicada principalmente al oriente de los Andes, mientras que *Lachesis acrochorda* se distribuye en los bosques húmedos del Chocó biogeográfico, bosque húmedo de la cuenca media del río Magdalena, al norte del departamento de Antioquia y al sur de Córdoba (1).

### 2.1.2.1 *Bothrops rhombeatus*

El río Cauca se ha convertido en una barrera geográfica para algunas especies de serpientes, debido a que en sus primeros 80 km de recorrido posee una alta carga de ácido sulfúrico y clorhídrico (16), quedando *B. rhombeatus* restringida al norte del río Cauca, diferenciándose de la población de *Bothrops sp.* del sur del río (Figura 2-1-b).

*B. rhombeatus* también es conocida como “equis amarilla del Cauca” “equis gata”, “equis pelo de gato” (15).

Figura 2-1: Distribución de *Bothrops rhombeatus* en Colombia y en el departamento del Cauca (16)



Adaptado de: Taxonomía de *Bothrops asper*, *B. ayerbe* y *B. rhombeatus*, Folleco, 2010

Se adapta desde los 1.000 msnm hasta el bosque montano a 2.600 msnm, se ha encontrado desde el altiplano de Popayán hasta el Valle del Cauca, en la región conocida como “La Paloma” del municipio “El Tambo” y en “Las Chozas” del municipio de “Timbío”, en la zona de bosque espeso a orillas del afluente del río Cauca, en el valle alto del río Cauca al Este de la Cordillera Occidental y al Oeste de la Cordillera Central (1,16,38). Hacia el norte se ha visto en “La Mojana” entre los departamentos de Antioquia, Bolívar y Córdoba, en la bifurcación de los ríos Patía y Cauca. En la figura 2-1-a se observa la distribución en color azul de *B. rhombeatus*, verde para *B. asper* y rojo *B. ayerbe* (16).

En el estudio realizado por Ayerbe y colaboradores (38) se establecieron los rasgos morfológicos diferenciales con otras especies, siendo característico para *B. rhombeatus* las figuras sobre el dorso (alrededor de 15) de color café-rojizo a café oscuro en forma de ángulos, que no alcanzan a formar la equis perfecta al estar separados por la línea media dorsal, configurando la forma de rombos con algunos bordes claros o blancos (Figura 2-2). No se conoce hasta el momento la frecuencia del accidente ofídico específica por *B. rhombeatus* posiblemente por la dificultad de diferenciarla de otras especies *Bothrops* al momento del accidente, el desconocimiento del efecto tóxico del veneno y consecuentemente del cuadro clínico producido.

Figura 2- 2: Foto de *Bothrops rhombeatus* Fundación Zoológica de Cali



Cortesía: Carlos Galvis 2019, Fundación Zoológica de Cali

## 2.2 Componentes del veneno de serpiente

El veneno de serpiente es producido en una glándula exocrina especializada (39) y su composición puede variar a nivel inter e intraespecie por causa multifactorial (40,41). Los venenos son mezclas únicas de péptidos y proteínas diseñados por selección natural para adaptarse a un ecosistema con la finalidad de poder actuar específicamente sobre el sistema vital de sus presas. El veneno en este sentido, representa un rasgo adaptativo trófico de “evolución divergente y convergente” (41) que además está sujeto a un proceso de selección positiva o también llamado “evolución acelerada” (41). Este proceso biológico necesita de la variación genética como promotor para diversificar las toxinas, siendo codificado por familias multigénicas capaces de expresar entre 30-200



proteínas y de esta forma poder variar la abundancia relativa y distribución entre géneros, especies y subespecies (42). Los mecanismos ambientales y moleculares que generan esta diversidad permanecen poco claros. A continuación en la tabla 2-1, se visualiza la actividad enzimática y biológica de algunos péptidos y proteínas presentes en los venenos de serpiente (43).

Tabla 2-1. Actividad de algunos péptidos del veneno de serpiente (43).

Componente	Peso molecular (KDa)	Actividad enzimática	Actividad biológica
PLA <sub>2</sub> I y II	12-14	Hidrólisis del enlace éster de los fosfolípidos de membrana	Miotoxicidad, formación de edema, efecto anticoagulante, hipotensión, neurotoxicidad.
svMP	25-70	Proteolítico, degradación estructural de proteínas de membranas basales y vasos sanguíneos	Induce sangrado local y sistémico
LAAO	50-70	Desaminación oxidativa de l-aminoácidos produciendo peróxido de hidrógeno, $\alpha$ cetoácido, amonio.	Efectos sobre la agregación plaquetaria,
5' Nucleotidasa	53-82	Hidrólisis de enlace éster en la posición 5' del ADN y ARN	Inhibición de la agregación plaquetaria
AChE	55-60	Hidrólisis de acetilcolina y grupo acetato	Generación de fasciculaciones y contracciones musculares involuntarias
Toxinas de tres dedos de tipo $\alpha$ -neurotoxina (3FTx)	6-9	Inhibe los receptores de acetilcolina postsinápticos en la unión neuromuscular, bloqueo de canales de calcio tipo L,	Neurotoxicidad postsináptica
CRISP	20-30	Bloquea los canales de calcio y nucleótidos cíclicos	Inhibición de la contracción del músculo liso
Lectinas tipo C	Compuesto por dos subunidades: cadena $\alpha$ : 14-15 Cadena $\beta$ : 13-14	Inhiben o activan receptores específicos de los factores de coagulación	Anticoagulación
Desintegrinas	5-10	Bloqueo de diversos factores de integrina	Inhibe la agregación plaquetaria, entre otros.
Péptidos natriuréticos	3,5 – 4	Inhiben la enzima convertidora de angiotensina. Interactúa con los receptores de guanilil ciclasa aumentando los niveles de GMPc	Vasodilatación, diuresis, promueve la excreción de sodio y agua

Teniendo en cuenta la variabilidad en la composición bioquímica de los venenos, los ensayos de toxicidad son una herramienta fundamental para conocer el mecanismo de acción del veneno, correlacionarlo con la acción in vitro de cada uno de los componentes y las diferencias en el cuadro sindrómico producido por la misma especie de diferente ubicación geográfica y tamaño. Posteriormente se debe profundizar su estudio con las herramientas ómicas actuales (proteómica y venómica).

### 2.2.1 Proteínas del veneno de serpiente del género *Bothrops*

Cada familia de proteínas puede ejercer diversos efectos locales o sistémicos, solas o en su conjunto. Cada familia de proteínas presenta algunas propiedades que definen su inmunogenicidad, como el tamaño, masa, estructura o tipo de proteína, las modificaciones post-traduccionales, además de su concentración en el veneno (44). En un estudio realizado por Angulo y Lomonte del ICP (45) se compararon los resultados de diversos trabajos de aislamiento y purificación de las proteínas del veneno de *B. asper*, algunas de las toxinas representativas se enumeran en la tabla 2-2.

Tabla 2-2. Componentes del veneno de *Bothrops asper* (45).

Familia	Proteínas	Propiedades		
		a(KDa)	b	c
PLA <sub>2</sub> , D49	PLA I	32	Ácida	
	PLA II	16	Ácida	
	PLA <sub>2</sub> 1	11	Ácida	
	PLA <sub>2</sub> 2	11	Ácida	
	PLA <sub>2</sub> 3	29	Ácida	
	Miotoxina 1	15	Básica	
	Miotoxina PLA <sub>2</sub>	15	Basica	
PLA <sub>2</sub> K49	Miotoxina II	15	Básica	
	Miotoxina IV	15	Básica	
PLA <sub>2</sub> Asp49	Basp PLA <sub>2</sub> II	14	Ácida	4.9
SvMP III	Proteinas G	18	Neutra	7.1
	BaH1	64	Ácida	4.5
	BH2	26	Ácida	5.2

Tabla 2-2 (Continuación)		
Familia	Proteínas	Propiedades a(KDa)    b    c
	BH3	55    Ácida    5.0
	BaH4	69    Ácida    5.3
	Basparina A	70    Ácida
svMP	Asperaza	30    Ácida
	Ficozima	25    Ácida
	Lao 2	125    Ácida
	Lao 2b	125    Ácida
Proteína similar a lectina tipo C	Aspercetina	30    Ácida
Desintegrina	Bothrasperina	8    Ácida
Columna "Propiedades". a: masa molecular; b: carácter ácido o básico de la proteína; c: punto isoelectrico. Columna "Secuencia", código de secuencia de aminoácidos en la base de datos UniProt/Swissprot ( <a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a> ) (45,46)		

Adaptado de: Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* [Internet]. 2009;54(7):949–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>

Hay que tener en cuenta que el efecto tóxico de las proteínas no necesariamente está relacionado de manera directa con su inmunogenicidad, de esta forma existen proteínas muy tóxicas que son poco inmunogénicas (46). Además, la inmunogenicidad depende tanto de las propiedades de la proteína como del sistema inmune del hospedero (47).

Las investigaciones toxicológicas sobre *B. asper* se han centrado en estudiar las fracciones proteicas de su veneno debido al toxidrome que genera en los pacientes, su gravedad y a la alta frecuencia epidemiológica de ofidismo por esta especie. Cabe destacar el análisis proteómico del veneno de *B. asper* revelado por Alape-Giron y colaboradores (48), quienes observaron proteínas de al menos ocho familias con las siguientes frecuencias: svMP (41-44%), PLA<sub>2</sub> (29-45%), LAAO (5-9%), desintegrinas (1-2%), CTL ó proteínas similares (0.5%) y CRISP (0.1%).

## 2.3 Mecanismos de toxicidad del veneno de serpiente

### 2.3.1 Toxicocinética

Con relación a la toxicocinética, es entendida como los procesos de cambio en función del tiempo, desde el momento de la absorción, pasando por la distribución, biotransformación y eliminación de un xenobiótico dentro de un organismo. Para los venenos de la familia *Viperidae*, una vez ha sido inoculado el veneno por vía SC o IM, rápidamente se absorbe y llega a sangre y vasos linfáticos en función del peso molecular, de manera que a medida que aumenta el peso se dirige rápidamente a vasos linfáticos y a plasma (49,50). Por otro lado, es claro que no todo el veneno se absorbe del sitio de acción y su biodisponibilidad varía de un 4-81% por vía IM, mientras que SC es aproximadamente del 60%. Los componentes que no son absorbidos pueden ser retenidos en el sitio de inoculación, trayendo como consecuencia el daño local (43), además, dependiendo de la cantidad inoculada, siendo la familia *Viperidae* las especies que pueden inyectar hasta un 75% más veneno que *Elapidae*. El volumen de distribución es relativamente alta en comparación con el volumen sanguíneo, entre 0,054 - 0,07 L/kg en ratas, lo que permite deducir que hay un proceso de extravasación. Con respecto a la eliminación en un modelo monocompartimental con entrada de orden cero y cinética de primer orden, se encontró una vida media de eliminación para venenos de familia *Viperidae* de 9,71 +/- 1,29 h (43).

### 2.3.2 Toxicodinamia

#### 2.3.2.1 Mecanismo de acción del veneno de la familia *Viperidae*

Las PLA<sub>2</sub> hidrolizan glicerolfosfolípidos, liberando fosfolípidos y ácidos grasos. Dentro de sus efectos biológicos está la miotoxicidad, edema, hemólisis, inhibición de la agregación plaquetaria, CID y choque distributivo (32). Las SP actúan sobre las proteínas de la cascada de coagulación con una actividad similar a la trombina sobre el fibrinógeno, activación del factor V, de la proteína C, del plasminógeno, inducción de agregación plaquetaria y fibrinogenólisis. Las SP además, tienen una actividad similar a calicreína, liberando bradiquininas lo que aumenta la permeabilidad vascular y el efecto hipotensor (37). La fracción coagulante produce la formación de microcoágulos de fibrina, que se depositan en los capilares pulmonares, en tubo digestivo y a nivel renal,

esto puede conducir a microembolias que llevan a necrosis de tejidos distales y falla renal y cardíaca por efecto tóxico directo (51,52). Es importante resaltar que los componentes anteriormente mencionados tienen efectos simultáneos procoagulantes y anticoagulantes, desencadenando efectos sistémicos que conllevan al deterioro hemodinámico del paciente, como el choque distributivo y la CID.

## 2.4 Cuantificación proteica del veneno de serpiente

El estudio de los venenos de origen animal debe incluir métodos precisos para la cuantificación de las proteínas y a partir del resultado se puede definir los métodos de separación más efectivos para las mismas. Esta cuantificación debe realizarse antes y durante todos los procedimientos que se realicen con el veneno para garantizar un resultado certero en la investigación (53). Adicionalmente se deben incluir ensayos de actividad biológica de las proteínas puras o combinadas con el fin de determinar sus posibles acciones, debido a que el efecto tóxico en un órgano diana es el resultado de múltiples factores interrelacionados al momento de la mordedura de serpiente. Actualmente existen diversos métodos para la cuantificación de proteínas de los venenos y su uso depende básicamente de cinco factores; La cantidad total de proteína presente en la muestra, la concentración de la proteína, la especificidad del método, la presencia de otras sustancias que interfieran en la muestra y la reproducibilidad del método (47).

Entre los métodos para la cuantificación de proteína los más utilizados son los que se basan en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz, la formación de derivados químicos o la capacidad para unirse a ciertos colorantes. De acuerdo con la Ley de Lambert–Beer, existe una relación exponencial entre la transmisión de la luz a través de una sustancia y la concentración de esta, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Según esta ley, una (1) unidad de absorbancia en una cubeta de 1 cm<sup>3</sup> de luz de paso a través de la solución a 280 nm, es equivalente a 1 mg/ml<sup>-1</sup> de proteína (42). Por lo tanto, es posible deducir la concentración de la sustancia utilizando la absorbancia, el coeficiente de extinción molar y la longitud de la celda. El coeficiente de extinción molar es una medida de la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración. Un compuesto con alto valor de coeficiente de extinción molar es muy eficiente para absorber la luz a una longitud de onda adecuada y por lo tanto puede

detectarse por medidas de absorción cuando se encuentra en disolución a concentración baja (54,55).

En la tabla 2-3 se comparan los diversos métodos de cuantificación de proteína más utilizados.

Tabla 2-3 Comparación de diferentes métodos de cuantificación de proteína (42,47,54).

Método		Rango de sensibilidad (µg/ml)	Cálculo de la concentración	Observaciones
Métodos de absorción	A280	0,1-100	$\varepsilon_{280} = 1 \text{ ml/mg cm}$	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV. No se pierde la muestra.
	A205	3-100	$\varepsilon_{205} = 31 \text{ ml/mg cm}$	
	A260-280	100-3.000	Proteína (mg/ml) = $(1.55 A_{280} - 0.76 A_{260})$	
	A235-280	25-700	Proteína (mg/ml) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$	
Métodos Derivados colorimétricos	Biuret	1000-10.0000	$\varepsilon_{545} = 0.06 \text{ ml/mg cm}$	Tiene baja sensibilidad. Específico para proteínas. Muestra pocas interferencias.
	Lowry 750 nm	10-1000	Usar curva estándar	Tiene sensibilidad intermedia-alta. Interferencia con detergentes no iónicos, sulfato amónico.
	Bradford 470 nm	20-2000	$\varepsilon_{595} = 81 \text{ ml/mg cm}$	Sensibilidad alta. Presenta interferencias con detergentes
	BCA 562 nm	20-2000	Usar curva estándar	Método con sensibilidad más alta. Menos interferencias.
Métodos derivados fluorimétricos	o-ftalaldehído	1-5 excitación a 340 nm	Usar curva estándar	Tiene sensibilidad intermedia-alta. Interferencia con aminos contaminantes.
		Emisión a 475 nm		

Dentro de los métodos colorimétricos, el método de Bradford y Lowry son los más utilizados dado que son sensibles a detección de aminoácidos aromáticos, sin embargo, el método de Ácido Bicinconínico (BCA) es el más sensible. Hay que tener en cuenta que este último método no tiene un punto final de la reacción, debido a que el color continúa desarrollándose a una baja velocidad.

## **2.5 Separación de proteínas del veneno de serpiente**

Los métodos para la purificación de las proteínas son variados. Para seleccionar el método más adecuado se deben tener en cuenta las características de las proteínas que se van a separar, como tamaño y forma, carga neta y biopropiedades (56). Las técnicas más utilizadas para el fraccionamiento de las proteínas de veneno de serpiente son la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El método más utilizado es la electroforesis que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) el cual es un método relacionado con la migración de proteínas mezcladas con el detergente aniónico SDS, formando complejos desnaturalizados cargados negativamente, bajo la influencia de un campo eléctrico continuo, teniendo en cuenta las propiedades de las proteínas (57). De esta manera se permite el análisis de la proteína en su forma nativa o desnaturalizada. La cantidad de SDS que se puede unir a las proteínas depende de su tamaño, aproximadamente 1,4 g SDS/g proteína.

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un proceso de separación diferencial donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente (58). Inicialmente se utilizó para separar compuestos polares, siendo la fase estacionaria de un carácter altamente polar y la fase móvil poco polar. Posteriormente con el fin de separar ácidos grasos se revirtió la polaridad de las fases y se desarrolló la cromatografía de fase reversa RP-HPLC, en la que la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar (59). Esta última se ha convertido en la técnica más utilizada para la separación de las proteínas de los venenos animales, tiene selectividad a las muestras con carácter alifático o aromático y además puede proporcionar información cuantitativa acerca de las especies separadas (59).

## 2.6 Evaluación de letalidad del veneno de serpiente

La evaluación de toxicidad de los venenos de serpiente se realiza tomando en cuenta la concentración de proteína del veneno y la especie animal sobre la cual va a ser probado el veneno. Debido a la variabilidad de las especies que se pueden utilizar como animales de experimentación, se ha limitado la prueba de Dosis Letal Media  $DL_{50}$  a la especie *Mus musculus* de las cepas CD1 o *Balb-c*, con peso entre 18 - 20 g (53). La especie *Mus musculus* ha sido ampliamente utilizada para las pruebas toxinológicas debido a su facilidad de producción a nivel controlada en bioterio, su corto periodo reproductivo y de destete y la facilidad de manejo en los procedimientos, lo cual permite el uso de animales jóvenes con peso menor a 25 gramos (47). Los ratones CD-1 se caracterizan por una naturaleza dócil, alta productividad, rápido crecimiento y baja incidencia de tumores espontáneos, son un modelo exocriado según lo recomendado en el anexo 5 de la Guía de la OMS, utilizado en particular en toxicología, neurobiología, oncología, infección, farmacología y también en la evaluación de seguridad de productos (53). Es el modelo más utilizado en la mayor parte de experimentos in vivo y biomédicos, es el animal de prueba preferido para conocer la reacción de un mamífero frente a una agresión, intoxicación o infección experimental (60), igualmente descrito como ideal para evidenciar las reacciones o trastornos inmunológicos, oncológicos y teratogénicos (61).

### 2.6.1 Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ )

La actividad letal es el principal parámetro de toxicidad de una sustancia. Los venenos de serpiente son cocteles de péptidos y proteínas en su mayoría, para el caso de las serpientes de la familia *Viperidae* la letalidad de su veneno tiene una causa multifactorial. Se denomina Dosis Letal Media a la cantidad de veneno letal para la mitad de un grupo de murinos o animales de experimentación, generalmente se utilizan ratones de las cepas CD1 o *Balb-c* (53).

## 2.7 Afinidad inmunoquímica

Las técnicas inmunoquímicas se basan en el principio básico de que un anticuerpo (Ac) se une a un antígeno (Ag) con cierta especificidad, formando un complejo Ag-Ac, interactuando por complementariedad espacial. Debido a las múltiples formas moleculares del antígeno y del epítipo, existen muchos sitios posibles de unión, la asociación



específica entre ellos es dependiente de los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas (47). Estas uniones entre Ag-Ac son reversibles y si el Ac se une con fuerza al Ag se denominan anticuerpos de alta afinidad. La afinidad es la fuerza del Ag-Ac en un punto de interacción, cuando existen varios puntos de unión se denominan complejos multivalentes y se aumenta la avidéz; Esta última es la medida de estabilidad o fuerza del complejo Ag-Ac y está determinada por la afinidad al epítotope, las valencias y la estructura de la interacción (62). La afinidad y la avidéz son los principales factores que definen la especificidad del anticuerpo.

Las técnicas inmunoquímicas utilizadas por lo tanto, se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac, aprovechando la propiedad que tienen las inmunoglobulinas para unirse a los antígenos, a la especificidad de la unión y la visualización de la misma por mecanismos directos o indirectos (62). Entre los principales métodos analíticos basados en la unión Ag-Ac, se encuentran las técnicas de inmunoaglutinación, fluorescencia y citometría de flujo, inmunofluorimétricas, inmunorradiológicas, inmunoenzimáticas, Western blot y cromatografía de afinidad.

## **2.8 Antivenenos antiofídicos**

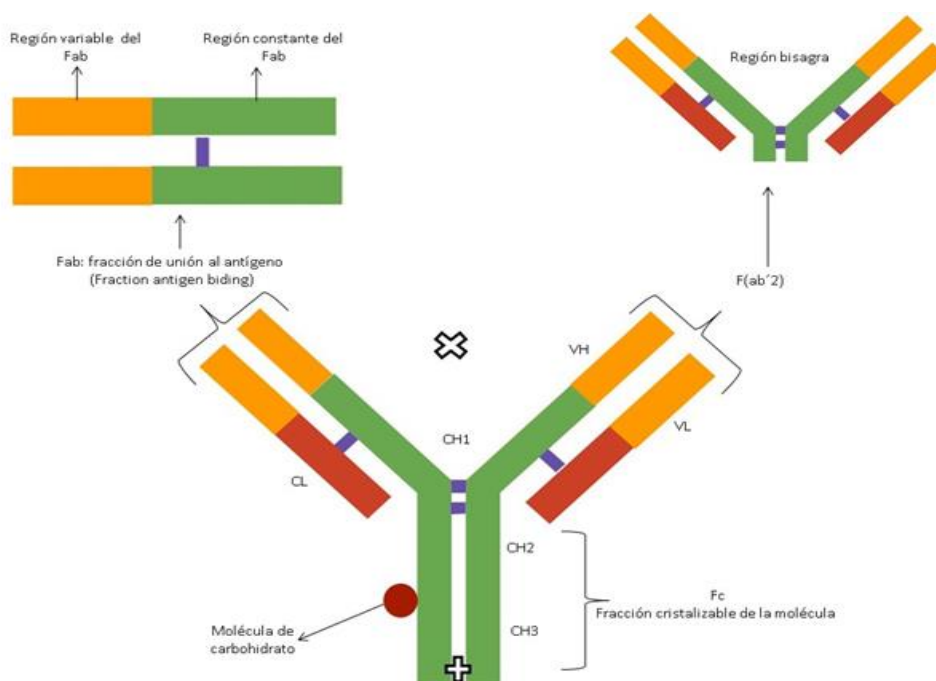
El antiveneno antiofídico es un producto biológico compuesto de inmunoglobulinas G (IgG) o una fracción de estas. Conocido también como suero antiofídico, es el resultado obtenido a través de la purificación del plasma de un animal previamente inmunizado utilizando veneno de una o varias especies de serpiente (63).

Con respecto a la neutralización del veneno, los antivenenos polivalentes para una misma familia pueden mostrar disminución de la mortalidad en los pacientes con ofidiotoxicosis, incluso si éste no es específico para una especie en particular, considerada un efecto por neutralización cruzada y ocurre debido a que algunas porciones de las proteínas del veneno que está causando el cuadro clínico, son similares a las proteínas con las cuales se inmunizó el animal productor de las inmunoglobulinas y por lo tanto son reconocidas y neutralizadas (64–69).

### 2.8.1 Diferencias entre los antivenenos antiofídicos

Los primeros antivenenos fueron compuestos de IgG completas y proteínas de origen animal. La segunda generación son IgG completas purificadas de aproximadamente 150 KDa y se denominan comercialmente sueros antiofídicos. La siguiente generación son los faboterápicos los cuales se componen de fracciones de unión a antígeno, tanto Fab como  $F(ab')_2$  con peso que oscila entre 100-50 KDa respectivamente (Figura 2-3). El peso molecular de los antivenenos afecta uno de los parámetros farmacocinéticos de mayor importancia como es el volumen de distribución (Vd) y la vida media. Las IgG tienen un Vd bajo y una vida media larga, lo que significa que permanecen más tiempo en circulación biodisponibles para interactuar con los epítopes, pero también quedan expuestos por más tiempo al sistema inmunológico del paciente activando las cascadas proinflamatorias (70,71). Los faboterápicos poseen bajo peso molecular y alto Vd permitiéndoles llegar a la vasculatura distal y microvasculatura (72), tienen una vida media corta y son eliminados fácilmente, disminuyendo el tiempo de exposición al sistema inmunológico del paciente (73).

Figura 2-3. Esquema de la inmunoglobulina IgG completa,  $F(ab)_2$  y Fab



Tomado de: Sarmiento, 2020 (71)

Los faboterápicos  $F(ab')_2$  pueden activar el sistema de complemento por su región bisagra y presentan RAM a un nivel intermedio entre las IgG completas y los Fab (74). Por lo tanto, los faboterápicos Fab se consideran los más seguros comparado con las otras generaciones debido a que no activan el sistema complemento. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción o farmacodinamia de los antivenenos antiofídicos, la neutralización Ag-Ac se basa en el acoplamiento del epítipo a la porción Fab o  $F(ab')_2$  de la inmunoglobulina de manera específica y del tiempo de permanencia en la sangre.

### 2.8.2 Antivenenos antiofídicos polivalentes en Colombia

En Colombia el ofidismo es una enfermedad desatendida y el antiveneno antiofídico es actualmente un medicamento vital no disponible, lo que otorga la posibilidad de importación de este medicamento desde otros países (75). Los antivenenos antiofídicos comerciales en Colombia son polivalentes tanto para familia *Viperidae* y como para familia *Elapidae*. En este trabajo se compraron los antivenenos polivalentes para familia *Viperidae* provenientes del sector público y privado: el antiveneno del Instituto Nacional de Salud (INS) y al antiveneno Antivipmyn-Tri de Bioclón (AVP-T).

Es de aclarar de que ninguno de los dos antivenenos describe las especies específicas con las cuales se desarrollaron los antivenenos ni la región de donde provienen las serpientes. El INS tiene una presentación de una caja con dos viales de 10 mL con solución inyectable de IgG específica purificada líquida. “Cada 10 mL de suero neutralizan mínimo: 10 mg de veneno *Crotalus sp* y 70 mg de veneno *Bothrops sp*. Por reacción cruzada, cada vial neutraliza como mínimo 15 mg de veneno *Lachesis muta* (Ecorregión Amazónica) y 50 mg de *Lachesis acrochorda* (Ecorregiones Pacífica y Valles Interandinos)” (18).

El antiveneno AVP-T es producido por Bioclon, de México. Este antiveneno tiene una presentación comercial de una caja con 1 frasco de 10 mL con “solución inyectable liofilizado que contiene Faboterápico  $F(ab')_2$  polivalente antiofídico con capacidad neutralizante de 30 mg de *Bothrops sp*, 7mg de veneno de *Crotalus sp* y 15 mg de veneno de *Lachesis sp*” (21).

### 2.8.3 Dosis efectiva Media (DE<sub>50</sub>)

Uno de los principales parámetros de evaluación de calidad de los antivenenos es la Dosis Efectiva Media, conocida como capacidad neutralizante y radica en la cantidad de antiveneno necesario para mantener con vida a la mitad de una población de murinos envenenados experimentalmente. La especie más utilizada son ratones albinos *Mus musculus* de las cepas CD1 ó *Balb-c*. Este ensayo de neutralización de la actividad letal de los venenos por anticuerpos permite conocer la cantidad de veneno que puede neutralizar 1ml de antiveneno (42).

## 3. Metodología

### 3.1 Estrategia experimental

Para dar cumplimiento a los objetivos se utilizaron métodos de separación de proteínas como electroforesis y RP-HPLC, métodos inmunoquímicos como ELISA que permite cuantificar el reconocimiento de un anticuerpo hacia un antígeno, métodos que combinan la especificidad de la detección inmunoquímica con la electroforesis como el Western Blot y la cromatografía de afinidad con la cual se puede cuantificar el acoplamiento de un antiveneno a las proteínas del veneno. Además, se verificó la potencia de los venenos calculando la  $DL_{50}$  y para los antivenenos la  $DE_{50}$  y así comparar su capacidad neutralizante.

Tabla 3-1. Fase experimental para la comparación de los antivenenos

Fase	Prueba	Laboratorio	Av INS	Av AVP- T	INS + veneno completo	AVP-T + veneno completo	Veneno completo	Fracciones del veneno	INS + fracciones del veneno	AVP-T + fracciones del veneno
Cuantificación de proteína	BCA	IBT	✓	✓			✓			
	Absorbancia 280	IBT - IBUN	✓	✓			✓	✓		
	Bradford	IBT	✓	✓			✓			
Bioquímica	SDS-PAGE	IBUN-IBT	✓	✓			✓	✓		
	RP-HPLC	IBUN - IBT					✓			
Biológica/ toxicidad	$DL_{50}$ IV	IBUN - IBT					✓			
	$DL_{50}$ IP	IBT					✓			
Inmunoquímica	$DE_{50}$ IP	IBT			✓	✓				
	Cromatografía de afinidad	IBT			✓	✓				
	Western Blot	IBT			✓	✓				
	ELISA	IBT			✓	✓				
	SDS-PAGE	IBT			✓	✓			✓	✓

## 3.2 Lugar de experimentación

### 3.2.1 Laboratorio de Análisis Instrumental del IBUN.

El laboratorio de análisis instrumental perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, (IBUN), está dirigido por la Doctora Ana Lucía Castiblanco. En este laboratorio están disponibles los equipos de cromatografía: GC, HPLC, FPLC y espectrofotómetro (76). El IBUN se fundó en diciembre de 1987, es una entidad interdisciplinaria líder en investigación y desarrollo de productos biotecnológicos, con visión de emprendimiento y capacidad de negociación con empresas, cadenas productivas y pequeños agricultores.

### 3.2.2 Laboratorio de Análisis de Toxinas del IBT

El laboratorio de análisis de toxinas dirigido por el Doctor Alejandro Alagón, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, perteneciente al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), está ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos y tiene dos líneas de investigación (77):

**Biotecnología de anticuerpos:** Dedicado principalmente al mejoramiento y desarrollo de nuevos antivenenos con estrategias de inmunización, uso de toxinas recombinantes, toxicocinética, anticuerpos monoclonales y policlonales. Su equipo ha generado novedosos antivenenos tanto para México como Estados Unidos, Europa, Africa y Medio Oriente.

**Toxinología.** Estudian los venenos de varias especies de serpientes de coral, víboras cascabel, cantiles y nauyacas. Su investigación sobre los venenos se enfoca en los componentes, desarrollo de tecnologías y ómicas para el estudio de las toxinas y mecanismos de acción de importancia fisiopatológica.

## 3.3 Aprobación del comité de ética

Este proyecto se desarrolló posterior a la aprobación del Comité de la Facultad de Medicina, quien debido al tipo de experimentación delegó para este fin al Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (MVZ) de la Universidad Nacional de Colombia (UN) (Anexo A).

### 3.4 Análisis estadístico

- Para observar las diferencias entre los métodos utilizados para la cuantificación de proteína de los venenos y de los antivenenos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), previo a una prueba de normalidad. Se utilizó el programa Excel 6.0, se realizó el ANOVA utilizando una prueba F con un 95% de confianza, se determinó un valor de  $p < 0.05$ .

Ho = No hay diferencia entre los métodos para calcular la proteína de los venenos y antivenenos, con 95% de confianza.

Hi = Al menos un método es diferente para el cálculo de proteína, con 95% de confianza.

- Para encontrar diferencia estadística en el reconocimiento inmunoquímico de los antivenenos hacia los venenos de la prueba ELISA, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) posterior a una prueba de normalidad. Se utilizó el programa Excel 6.0. Se realizó el ANOVA utilizando una prueba F con un 95% de confianza, se determinó un valor de  $p < 0.05$ .

Ho = No hay diferencia entre los antivenenos comparando el reconocimiento inmunoquímico de la prueba ELISA, con 95% de confianza.

Hi = Al menos un antiveneno es diferente en el reconocimiento inmunoquímico de la prueba ELISA, con 95% de confianza.

- Para encontrar la dosis letal media calculada y la dosis efectiva media calculada, se realizó una regresión no lineal tipo sigmoide dosis – respuesta variable dependiente, como método estadístico no paramétrico, según la recomendación de la OMS en su anexo 5. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 6.0b.

### 3.5 Animales de experimentación

La manipulación de los animales se realizó por la investigadora teniendo en cuenta la certificación del Curso de Formación de Usuarios de Modelos Animales con Fines Experimentales, emitido por Los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), la Universidad de los Andes y la Universidad Nacional de Colombia, emitido en octubre del 2018 (Anexo B).

Para las pruebas DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub> se utilizaron ratones albinos *Mus musculus*, cepa CD1, con peso entre 18-20 gr, machos y hembras, provenientes y mantenidos en el Bioterio de MVZ de la UN y en el Bioterio del IBT de la UNAM. Los animales se mantuvieron en cajas de Syphone® con cama de viruta, en condiciones medioambientales constantes a temperatura ambiente a 23 +/- 3 °C, con agua y alimento *ad libitum*, reguladas por las dependencias de cada una de las Universidades. En las pruebas de DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub> se buscó la curva de 0-100% de mortalidad y sobrevivencia respectivamente, en ambos casos se inoculó a cada animal un volumen máximo de 0,5 ml IP. Cada prueba se planificó para tener 5 niveles, usando 3 ratones por cada nivel con asignación aleatoria verificando el peso de los animales previamente, posterior a su inoculación se ubicó cada grupo de animales en la misma caja de acuerdo con el nivel de prueba.

## 3.6 Evaluación de los venenos

### 3.6.1 Origen del veneno

El veneno de *B. rhombeatus* se obtuvo de 1 individuo adulto de la Fundación Zoológica de Cali (FZC), proveniente de la zona pacífica del Valle del Cauca, Colombia, mediante un convenio de investigación entre el FZC y el IBUN. De esta especie solo se encontró 1 ejemplar en cautiverio en todo el territorio nacional, por lo cual se realizó el procedimiento de ordeña para la extracción del veneno en 3 ocasiones. El veneno se almacenó en crioviales y se conservó de acuerdo al protocolo de colección de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (53).

Las muestras de veneno puro se mantuvieron en frío durante el transporte, fueron congeladas a -80°C y posteriormente liofilizadas en el IBUN. Para las pruebas se consolidó una mezcla del veneno seco de las 3 recolecciones con el fin de homogenizar los componentes de cada uno, se distribuyó en 5 crioviales y se le asignó el número de lote FZC 041119. Se utilizó veneno mexicano de *B. asper* lote "Fórmula magistral" y *B. atrox* lote 30X8901, los cuales fueron suministrados por el Dr. Alagón y pertenecen al IBT. Los venenos se encontraban liofilizados y sirvieron como patrón de comparación para las pruebas realizadas. Todos los viales y alícuotas para las pruebas se mantuvieron en congelación a -20°C y en el momento de las pruebas se mantuvieron refrigerados.



### 3.6.2 Cuantificación de proteínas del veneno de serpiente

El veneno fue cuantificado por tres métodos con el fin de determinar el nivel de variación entre ellos, Absorbancia 280 nm, BCA y Bradford.

#### 3.6.2.1 Peso seco

Se tomó el peso del veneno deshidratado teniendo en cuenta que este peso corresponde aproximadamente entre 90 - 95% a proteínas y el 5% restante a componentes no proteicos. Del proceso de extracción de *B. rhombeatus* se obtuvieron 5 viales de veneno seco tras ser liofilizado en el IBUN y posteriormente fueron pesados. En el IBT se manejaron 3 viales de veneno de *B. rhombeatus* de los cuales se tomaron 5 mg de cada uno para formar una mezcla de 15 mg, con la cual se realizaron todos los experimentos realizados en el IBT. La mezcla de veneno de *B. rhombeatus* de 15 mg en peso seco fue reconstituida en 7.6 mL de PBS 1x, se centrifugó durante 30 seg a 300 rpm para homogenizar la muestra y se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 850  $\mu$ L.

Se pesaron 2 mg de veneno de *B. asper* y se reconstituyó en 1 mL de PBS, del veneno de *B. atrox* se pesaron 3 mg y se reconstituyó en 1,5 mL de PBS. Todos los venenos se llevaron a una concentración de 2 mg/mL.

#### 3.6.2.2 Cuantificación por Absorbancia 280 nm

Inicialmente se determinó el contenido proteico del veneno mediante cuantificación directa a 280 nm en el equipo Thermo Scientific Nanodrop® spectrophotometer del IBUN, el cual realiza una calibración interna y una corrección a 280 nm, obteniendo así una lectura directa de la concentración. La ventaja tecnológica de este equipo está en función de emplear micro volúmenes de muestra, mediante las propiedades de tensión superficial de gota formada. Se tomó un vial con peso seco de 31.6 mg y se reconstituyó en 100 mL de PBS 1x y se realizó medición directa de la absorbancia utilizando alícuotas de 2  $\mu$ L. Posteriormente utilizando el espectrofotómetro se determinó la concentración de proteína antes de cada experimento, asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL y el rango de sensibilidad por absorbancia 280 nm es de 50  $\mu$ g/mL a 2 mg/mL.

Para el cálculo hay que tener en cuenta que la concentración en mg/mL es igual a la absorbancia obtenida dividida entre el cociente de extinción de la muestra que en este caso es 1 y la longitud del paso de la luz (42). La lectura de la absorbancia se basa fundamentalmente en la presencia de aminoácidos aromáticos principalmente el grupo

fenólico de la tirosina y el grupo indólico del triptófano. Los venenos de *B. asper*, *B. rhombeatus* y *B. atrox* se llevaron a una concentración de 2 mg/mL y se hicieron diluciones seriadas para los 3 venenos de 1:10- 1:15- 1:20- 1:25 con un volumen final para cada muestra de 500  $\mu$ l. Esta prueba se realizó por duplicado (Anexo C).

### 3.6.2.3 Método del ácido bicinconínico BCA

El ácido bicinconínico soluble es un reactivo sensible, estable y específico para reaccionar con el ión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ). El responsable de la reacción colorimétrica es la presencia de las cadenas laterales de la fenilalanina, triptófano y tirosina, además de los enlaces peptídicos, que reaccionan con el ión cúprico en un medio alcalino produciendo iones cuprosos.

La interacción de dos moléculas de BCA con una de cuproso en un medio alcalino forma un color púrpura y se conoce como la reacción de Biuret (55). El producto de la reacción presenta una fuerte absorbancia a 570 nm. La ventaja de este método es poseer una alta sensibilidad (0.5  $\mu$ g a 1.2 mg/mL) y una gran tolerancia a compuestos que puedan interferir en la reacción (54). Para el cálculo de la concentración proteica de los venenos y antivenenos se construyó una curva de calibración a partir de 5 concentraciones seriales de un patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de acuerdo con el protocolo estandarizado por el IBT y la lectura se midió a una longitud de onda de 570 nm (Anexo D). Los resultados mostrados en el trabajo tienen en cuenta la concentración de proteína determinada por este método. Esta prueba se realizó por duplicado. Como estándar se empleó BSA 1 mg/mL con diluciones en serie, sembrando en microplacas y realizando lectura de absorbancia a 570 nm. Los venenos de *B. asper*, *B. rhombeatus* y *B. atrox* se manejaron a una concentración de 2 mg/ml y se hicieron diluciones de cada veneno de 1:10 –1:15 – 1:20 –1:25 –1:30. Se prepararon los estándares a 320  $\mu$ g/mL, 160  $\mu$ g/mL, 80  $\mu$ g/mL, 40  $\mu$ g/mL y 20  $\mu$ g/mL.

### 3.6.2.4 Método de Bradford

Este método se basa en la unión de un colorante a una proteína que se quiere revelar, teniendo en cuenta que en un ambiente ácido las proteínas se pueden unir al colorante azul brillante de Coomassie G-250, lo anterior resulta en un cambio espectral del rojo /marrón del colorante ( $A_{\text{max}=465\text{nm}}$ ) a la forma azul del mismo ( $A_{\text{max}=610\text{nm}}$ ) (55). La diferencia entre las dos formas del colorante es mucho mayor a 595 nm, por lo tanto, esta es la mejor

longitud de onda para medir el color azul del complejo Proteína–Coomassie. El color está asociado con la presencia de los aminoácidos arginina, lisina e histidina y a la acción de fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas entre el colorante y la proteína (54).

Esta técnica se desarrolló de acuerdo con los protocolos del laboratorio del IBT (Anexo E). La curva se construyó usando 5 concentraciones de BSA con el estándar de albúmina marca Thermo Scientific-23209 a 500 µL; 250 µL; 125 µL; 62,5 µL; 31,25 µL y la lectura se midió a una longitud de onda de 595nm. Los venenos de *B. asper*, *B. rhombeatus* y *B. atrox* se llevaron a una concentración de 2 mg/mL y se realizaron diluciones seriadas para cada veneno de 1:5 – 1:10 – 1:15 – 1:20 – 1:25. Esta prueba se realizó por duplicado.

### **3.6.3 Separación de proteínas del veneno de serpiente**

Los métodos de separación de proteínas tienen en cuenta sus propiedades como el tamaño, la carga, las uniones o las características que le confiere una unión determinada, métodos que han sido complementados últimamente con procesos de purificación de estas (42).

#### **3.6.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Esta técnica es utilizada para separar moléculas teniendo en cuenta la masa y la carga bajo la influencia de un campo eléctrico. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza proteínas, rompiendo las interacciones no covalentes y además adicionando carga negativa. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo (57).

La separación de las proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Laemmli (78), adaptada de acuerdo con los protocolos del IBT y del IBUN (Anexo F y G respectivamente). Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Duodecil- sulfato sódico (SDS-PAGE) para observar los componentes proteicos de los venenos.

Se utilizaron los marcadores de peso Molecular (MPM) de marca AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder, Maestrogen. Se hicieron geles en condiciones no reductoras y reductoras con β-mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro de las proteínas.

La separación en ambos laboratorios se llevó a cabo en cámaras BIO-RAD, iniciando con un voltaje de separación de 70 mV dentro del gel concentrador y de 120 mV dentro del gel separador. Se realizaron geles por duplicado con SDS-PAGE al 15% utilizando veneno de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox* a una concentración de 2 µg/µl y se cargaron 15 µg y 30 µg de veneno por carril.

### 3.6.3.2 Cromatografía líquida de alta Resolución en fase reversa

En la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) se utiliza comúnmente un componente hidrofóbico como un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar. La purificación a gran escala de péptidos y oligonucleótidos sintéticos o proteínas recombinantes por cromatografía de fase reversa requiere de una alta resolución para la separación de estos compuestos (58,59).

Se realizó RP-HPLC para el veneno de *B. rhombeatus*, de acuerdo con el método estandarizado del IBT (Anexo H) y del IBUN (Anexo I). En ambos casos se utilizó una columna analítica C<sub>18</sub> (250 x 4.6mm).

En el IBUN se utilizó el programa LC Solution con una columna C<sub>18</sub> marca Lichrosphere C18-100-RD18. Cada corrida se realizó por triplicado, usando entre 2-3 mg de veneno *B. rhombeatus* en 200 µl (100 µl de TFA 0,1% + 100 µL de acetonitrilo) centrifugado a 14.000 rpm durante 3 min. Se utilizó un gradiente lineal de solución B de 5% durante los primeros 10 minutos, 5-15% de B en 10-30 minutos; 15-45% de B en 30-150 minutos y de 45-70% en 150-170 minutos, para un total de 180 minutos de corrida a un flujo de 1 mL/min.

En el IBT se utilizó el programa Galaxie Chromatography Data System con una columna C<sub>18</sub> marca XChroma™, para realizar RP-HPLC de los venenos *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*. Se empleó de cada veneno entre 2-3 mg en 300 µl, en 1.2 mL de agua con TFA 0.1% y centrifugado a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se utilizó un gradiente lineal de solución B de 5% en los primeros 5 minutos, 5-15% de B en 5-15 minutos; 15-45% de B de 15-75 minutos y de 45-70% en 75-90 minutos, para un total de 90 minutos de corrida a un flujo de 1 mL/min.

### 3.6.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones del veneno

Se realizó SDS-PAGE para observar las bandas de las fracciones recogidas de los venenos de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*. Se utilizó el MPM Tris-Glycine 4-20% (AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder, Maestrogen), de acuerdo con el protocolo del IBT (Anexo F).

Se desarrolló la técnica en condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol en cámaras BIO-RAD, iniciando con un voltaje de separación de 70 mV dentro del gel concentrador y de 120 mV dentro del gel separador. Se recolectaron todas las fracciones observadas durante la cromatografía en fase reversa y se llevaron a secado. Posteriormente se analizó el cromatograma y se marcaron las fracciones significativas (números rojos en la parte inferior del mismo, Figura 4-8). Las fracciones seleccionadas fueron resuspendidas en PBS 1x dependiendo del volumen recolectado de la fracción. Para la planeación de los geles se tuvo en cuenta el volumen de resuspensión, su concentración por Abs 280 y la cantidad de veneno contenido en cada muestra para que cada carril tuviera 10  $\mu$ g de veneno.

### 3.6.4 Prueba de letalidad

Se realizó la Dosis Letal Media como única prueba de toxicidad de los venenos en este estudio, utilizando los protocolos para pruebas con animales de la OMS dispuestos en el Anexo 5 (53). Dado que las pruebas se realizaron en el Bioterio de la facultad de MVZ de la UN y en el Bioterio del IBT, se obtuvo la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (MVZ) y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

#### 3.6.4.1 Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)

Este método evalúa la toxicidad del veneno midiendo la cantidad necesaria de éste para matar la mitad de una población de murinos o animales de experimentación. Se utilizaron ratones albinos de la cepa CD1 entre 18-20 g, machos y hembras indiscriminadamente. Se estableció inicialmente una dosis de veneno teniendo en cuenta las referencias bibliográficas para *B. asper* y a partir de los resultados se fueron estableciendo los niveles de veneno que permitieron realizar una curva de mortalidad desde 0-100%.

Se realizó la  $DL_{50}$  por vía IV del veneno de la especie *Bothrops rhombeatus*, en el bioterio de la facultad MVZ, mientras que en el IBT se realizó la  $DL_{50}$  por vía IP teniendo en cuenta que posiblemente la  $DE_{50}$  requeriría volúmenes superiores a los permitidos por la vena lateral de la cola. Para la  $DL_{50}$  realizada el bioterio de MVZ se utilizaron 3 ratones de la cepa CD1 por nivel de veneno, con un volumen máximo inoculado de 0,2 mL por la vena lateral de la cola. Se observó y anotó la mortalidad a las 24 horas posterior a la inoculación. En el IBT se evaluó  $DL_{50}$  utilizando 3 ratones de la cepa CD1 por dosis de veneno, vía IP con un volumen máximo de 0,5 mL en cada animal. Se utilizaron como control en las pruebas los venenos de *B. asper* y *B. atrox*. Se observó y anotó la mortalidad a las 24 horas posterior a la inoculación. Esta prueba se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados graficando el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la cantidad de veneno, utilizando el método de regresión no lineal tipo sigmoide dosis–respuesta variable dependiente, con el software GraphPad Prism versión 6.0b, se estableció un protocolo que fue aplicado en los dos laboratorios (Anexo J).

## 3.7 Evaluación de los antivenenos antiofídicos

### 3.7.1 Origen de los antivenenos

Los antivenenos fueron adquiridos por compra directa en las instituciones o a través de los importadores autorizados a nivel nacional. Para la adquisición del antiveneno INS se realizó la gestión por correo electrónico a [comercializacion@ins.gov.co](mailto:comercializacion@ins.gov.co) de acuerdo con el proceso descrito en la página oficial (79) para la compra de 5 cajas de antiveneno antiofídico polivalente Lote 18SAP02 con fecha de caducidad Octubre 2021, registro sanitario N°: INVIMA 2012M-0013350. Para la compra del antiveneno AVP-T del Instituto Bioclon, se contactó la empresa Medical Kit Ltda como importador autorizado al correo [ventasoficina@medicalkit.org](mailto:ventasoficina@medicalkit.org) y se gestionó la importación de 6 cajas de antiveneno faboterápico polivalente antiofídico Lote B-7B-32 con fecha de caducidad Abril 2021 como medicamento vital no disponible. Para la cuantificación proteica de los antivenenos se realizaron los mismos procedimientos y métodos utilizados en los venenos.

### **3.7.2 Cuantificación de proteínas de los antivenenos**

Se realizó la cuantificación proteica de los antivenenos INS y AVP-T mediante espectrofotometría 280, método de Bradford y BCA por duplicado. Se utilizó solución salina 0.9% como reconstituyente y blanco. Se tuvo en cuenta el factor de corrección de las inmunoglobulinas (1,4) y la dilución de la muestra. AVP-T al ser liofilizado se reconstituyó en 10 mL de solución salina 0,9%, el antiveneno INS no requirió solución salina.

#### **3.7.2.1 Cuantificación por Absorbancia a 280 nm**

Este método se realizó en el IBT siguiendo el protocolo estandarizado del laboratorio (Anexo C). Se realizó una dilución de cada antiveneno de acuerdo con el peso de los componentes, el INS IgG con peso alrededor de 150 KDa, mientras que AVP-T está compuesto por F(ab')<sub>2</sub> con peso entre 50-100 KDa. Esta prueba se realizó por duplicado a una dilución de 1:100 para el antiveneno AVP-T y de 1:50 para INS.

#### **3.7.2.2 Método del ácido bicinconínico BCA**

Para el cálculo de la concentración proteica de los venenos y antivenenos se construyó una curva de calibración usando 5 puntos de concentración de BSA y la lectura se realizó a una longitud de onda de 570 nm (Anexo D). Esta prueba se realizó por duplicado a una dilución de 1:100 del antiveneno AVP-T y de 1:50 para INS.

#### **3.7.2.3 Método de Bradford**

Esta técnica se aplicó de acuerdo con los protocolos del laboratorio del IBT (Anexo E). Para el cálculo de las concentraciones proteicas mediante este método se construyó una curva de calibración a partir de 5 concentraciones de BSA utilizando el estándar de albúmina marca Thermo Scientific-23209. Esta prueba se realizó por duplicado, para el antiveneno INS se realizó una dilución seriada de 1:100 – 1:200 – 1:400 – 1:800 y para AVP-T de 1:15 – 1:20 – 1:25 – 1:30 teniendo en cuenta el peso aproximado de las fracciones que componen cada antiveneno y la concentración requerida para su lectura.

### 3.7.3 Separación de proteínas de los antivenenos

#### 3.7.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó SDS-PAGE al 15% para observar los componentes proteicos de los antivenenos INS y AVP-T. Se utilizaron los MPM Tris-Glicina 4-20%. Para el antiveneno INS se realizó una dilución 1:50 y para el AVP-T una dilución de 1:100 cargando máximo 15 µg por carril. La separación de las proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Laemmli (78), adaptada de acuerdo con los protocolos del IBT (Anexo F). Se desarrolló la técnica en condiciones no reductoras y reductoras con β -mercaptoetanol. Se utilizaron cámaras BIO-RAD, iniciando con un voltaje de separación de 70 mV dentro del gel concentrador y de 120 mV dentro del gel separador.

### 3.7.4 Prueba de neutralización

#### 3.7.4.1 Dosis Efectiva Media (DE<sub>50</sub>)

Para la prueba de neutralización DE<sub>50</sub> se siguió el procedimiento recomendado por la OMS dispuesto en el Anexo 5 de la Guía de Producción de Antivenenos (53).

Se utilizaron ratones albinos CD1 entre 18-20 g, machos y hembras indiscriminadamente. Se planearon las dosis de antiveneno teniendo en cuenta las especificaciones de los insertos y a partir de los resultados se fueron estableciendo los niveles de antiveneno hasta generar una curva de sobrevivencia desde 0-100%. Se planeó el experimento calculando una cantidad suficiente para inocular 3 animales por dosis, cada una de las dosis fue mezclada con 3DL<sub>50</sub> de veneno y solución salina hasta completar un volumen de 0,5 mL para cada animal, ésta mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37°C. La inoculación se realizó IP acorde con la vía utilizada para la realización de la DL<sub>50</sub>. Esta prueba se realizó para los venenos de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*. Se observó y se anotó la sobrevivencia a las 24 horas posterior a la inoculación (Anexo K).

Los resultados fueron analizados graficando el porcentaje de sobrevivencia en función del logaritmo de la cantidad de veneno, utilizando el método de regresión no lineal tipo sigmoide dosis – respuesta variable dependiente, con el software GraphPad Prism versión 6.0. Se estableció un protocolo que fue aplicado en los dos laboratorios.



### 3.8 Afinidad inmunoquímica antiveneno-veneno de serpiente

Las pruebas de reconocimiento inmunoquímico se desarrollaron siguiendo los protocolos del laboratorio del IBT.

#### 3.8.1 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

Se utilizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para detectar el nivel de reconocimiento (títulos) de los antivenenos INS y AVP-T a los componentes del veneno de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*, definiendo el nivel de reconocimiento como la cantidad de antiveneno necesaria para obtener la mitad de la respuesta máxima esperada a una absorbancia a 405 nm.

La técnica de ELISA para cuantificación de anticuerpos se basa en la unión del antígeno a la fase sólida, el cual es reconocido por los anticuerpos presentes en la muestra. Una vez lavado el material no unido, los anticuerpos son detectados mediante un conjugado anti-inmunoglobulina/enzima (47,80). La cuantificación de anticuerpos se realiza con el uso del espectrofotómetro detectando una señal de color a una Absorbancia de 405 nm, la cual se genera al agregar un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina, de reconocimiento específico hacia el primer anticuerpo (47).

Se realizaron diluciones seriadas y ensayos para estandarizar la curva de los dos antivenenos utilizados. Se sensibilizaron las placas con 100 µl de veneno completo en cada pozo a una concentración de 5 µg/mL, posteriormente se emplearon 150 µl de antiveneno en la primera columna de pozos, a una concentración de 700 µg/mL y se realizaron diluciones seriadas 1:3. Se utilizó como anticuerpo secundarios IgG de cabra anti-caballo (H+L) y F(ab)<sub>2</sub> de cabra anticaballo (para INS y AVP-T respectivamente) acoplados a fosfatasa alcalina a una dilución 1:4000 marca KPL. Se leyeron las muestras a los 10,15, 20 y 30 minutos después de la incubación siguiendo el protocolo del IBT (Anexo L).

#### 3.8.2 Western Blot

El Western blot es una técnica que combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoquímica, por medio de esta técnica se observan las bandas proteicas reconocidas por el antiveneno. El método se basa en que el veneno es electro-transferido a una membrana de nitrocelulosa posterior al reconocimiento por dos

anticuerpos. El primer anticuerpo es el antiveneno que debe unirse a la proteína del veneno, mientras que el segundo anticuerpo reconoce al primero. El segundo anticuerpo se encuentra acoplado a una enzima que degrada un sustrato adicionado y genera una señal colorida indicando los componentes reconocidos por los antivenenos (81).

Debido a que las proteínas del veneno en el gel están desnaturalizadas, esta técnica no permite observar el reconocimiento de epítopes estructurales que podrían ser relevantes, mientras que si se ven con la técnica ELISA, sin embargo, como ventaja, es que dado que se realiza a partir de geles de SDS-PAGE, proveen información del peso molecular de los antígenos reconocidos (47). Por medio de esta técnica se observaron las bandas proteicas de los venenos de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox* que fueron reconocidas por INS y AVP-T. Para esta técnica se realizó previamente una SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol. Cada carril se cargó con 4  $\mu$ g para cada veneno a concentración de 2  $\mu$ g/ $\mu$ l, + 10  $\mu$ l de PBS + 3  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Una vez obtenido el gel se prosiguió con el protocolo para la técnica de Western Blot del IBT (Anexo M). Para ello cada antiveneno se llevó a una concentración de 200  $\mu$ g/mL en 10mL teniendo en cuenta la cuantificación de proteína de cada antiveneno para el paso de incubación con el primer anticuerpo. Los componentes separados previamente fueron transferidos del gel hacia una membrana de nitrocelulosa mediante un campo magnético quedando inmovilizados sobre su superficie por uniones no covalentes, probablemente hidrofóbicas. La membrana de nitrocelulosa se trató con anticuerpos acoplados a una enzima para poder visualizar los componentes, en este ensayo se utilizó un anticuerpo de cabra anti-caballo IgG (H+L) a una dilución 1:2000 marca KPL lote N°120607.

### 3.8.3 Cromatografía de Afinidad

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción específica y reversible entre una proteína y una molécula acoplada a una matriz porosa conformada generalmente por resina (58). La proteína en cuestión se considera un afinante que va a unirse al ligando que se encuentra en la matriz de resina. Las interacciones entre ligando y afinante pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van Der Waals y/o puentes de hidrógeno. La proteína de interés puede ser eluida por cambios de pH, competencia con un ligando específico o inespecífico, fuerza iónica o polaridad (82). La cromatografía de afinidad se realizó para cuantificar la interacción entre los anticuerpos específicos presentes en los

antivenenos del INS y AVP-T, contra las proteínas de los venenos de *B. rhombeatus* y *B. asper*, de acuerdo con la técnica estandarizada por el IBT (Anexo N).

Para la creación de cada columna de antiveneno se utilizaron 0,7 g de sefarosa 4B-CNBr, teniendo en cuenta la cuantificación de proteína de cada tipo de antiveneno, se dializó 1 mL del antiveneno del INS y 3 mL del antiveneno AVP-T con 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub>. Para adherir a la resina se utilizó un total de 1,5 mg de veneno de *B. rhombeatus* para cada una de las columnas a una concentración de 2 mg/mL y se utilizó como control veneno de *B. asper* a la misma concentración.

Los cálculos se realizaron sumando la cuantificación de proteína por absorbancia a 280 nm de las soluciones eluidas posterior al acoplamiento, dividido entre el factor de extinción molar de las inmunoglobulinas y multiplicando por el volumen final del filtrado obtenido en cada ensayo. Se utilizó como blanco NaHCO<sub>3</sub> 1M. De esta manera se obtuvo una cantidad de veneno no acoplado, la diferencia con el total de veneno usado correspondió al acoplado a la columna de antiveneno.

#### **3.8.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones del veneno acopladas a los antivenenos**

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) para observar las bandas del veneno que fueron reconocidas por cada antiveneno. Se utilizaron los MPM Tris-Glicina 4-20%, de acuerdo con el protocolo del IBT (Anexo F). Se desarrolló la técnica en condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol en cámaras BIO-RAD, iniciando con un voltaje de separación de 70 mV dentro del gel concentrador y de 120 mV dentro del gel separador. Para esta técnica se requirió la recolección de las fracciones durante la cromatografía de afinidad durante el montaje de acoplamiento de cada columna de antiveneno con cada uno de los venenos (*B. rhombeatus* y *B. asper*). Posterior a la recolección, se cuantificó la proteína por absorbancia 280 nm de cada una. Del primer grupo de las fracciones eluidas se unieron en un solo tubo las fracciones con absorbancia significativa y se realizó el mismo procedimiento con el segundo grupo de fracciones. Posteriormente se cuantificó la absorbancia 280 nm, el volumen total recolectado de cada grupo, se dializó la mezcla con Acetato de Amonio 20nM y posteriormente se volvió a medir el volumen y la absorbancia. Se liofilizaron estas muestras toda la noche y se

resuspendieron en PBS, utilizando entre 400 - 750  $\mu$ l de PBS dependiendo de la cantidad de muestra, para la realización de los geles, previa cuantificación por Absorbancia 280 nm.

Se generaron 8 muestras de Ag-Ac acoplados. Con el veneno de *B. rhombeatus* se generaron las siguientes muestras de acuerdo con el grupo de las fracciones eluidas: INS + fracciones 3-7; INS + fracciones 17-23; AVP-T + fracciones 3-7; AVP-T + fracciones 16-22. Con el veneno de *B. asper* se generaron las siguientes muestras: INS + fracciones 4-10; INS + fracciones 16-28; AVP-T + fracciones 3-7; AVP-T + fracciones 19-27. Para la realización del gel se cargó 15  $\mu$ g de cada muestra por carril, 4 $\mu$ l de  $\beta$ - mercaptoetanol y PBS hasta completar un volumen total de 15  $\mu$ l por carril.

## 4.Resultados y análisis

### 4.1 Cuantificación de proteína

#### 4.1.1 Cuantificación proteica de los venenos

Inicialmente se pesaron los 5 viales obtenidos de las muestras en seco tras ser liofilizadas. En el IBT se tomaron 5 mg de 3 viales de veneno para formar una sola mezcla de 15 mg. Se pesaron 2 mg de veneno de *B. asper* y se reconstituyeron en 1 mL de PBS. Del veneno de *B atrox* se pesaron 3 mg y se reconstituyeron en 1,5 mL de PBS. Con respecto al veneno de *B. rombeathus* se pesaron 15 mg y se reconstituyeron en 7,6 mL de PBS. Esto se realizó para llevar los venenos a una concentración teórica de 2 mg/mL, tabla 4-1

Tabla 4-1: Peso en seco y concentración inicial de los venenos

Veneno	Lote	Peso mg	PBS de reconstitución mL	Concentración teórica
<i>B rhombeatus</i>	FZC-041119	15	7,6	2 mg/mL
<i>B asper</i>	Mix Fórmula magistral	2	1	2 mg/mL
<i>B atrox</i>	30X8901	3	1,5	2 mg/mL

##### 4.1.1.1 Absorbancia 280 nm

Inicialmente al recibo de las muestras de veneno de *B. rhombeatus* se realizó la cuantificación de proteína utilizando un Nanodrop® para tener un presuntivo utilizando una muestra mínima del veneno, por lo tanto, se realizó 1 ensayo con 5 repeticiones de la misma muestra.

Tabla 4-2: Cuantificación de proteína del veneno *B. rhombeatus* con Nanodrop®

# Vial	Peso (mg)	PBS reconstitución (mL)	Concentración promedio (mg/mL)	S	S <sup>2</sup>	Cv
5	31,6	0,1	97,02	4,94	24,5	0,05
S: desviación estándar S <sup>2</sup> : varianza Cv: Coeficiente de variación						

Se realizó la cuantificación de proteína para el veneno de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox* por duplicado utilizando el espectrofotómetro Abs 280 nm (Tabla 4-3) y posteriormente se verificó antes de cada experimento.

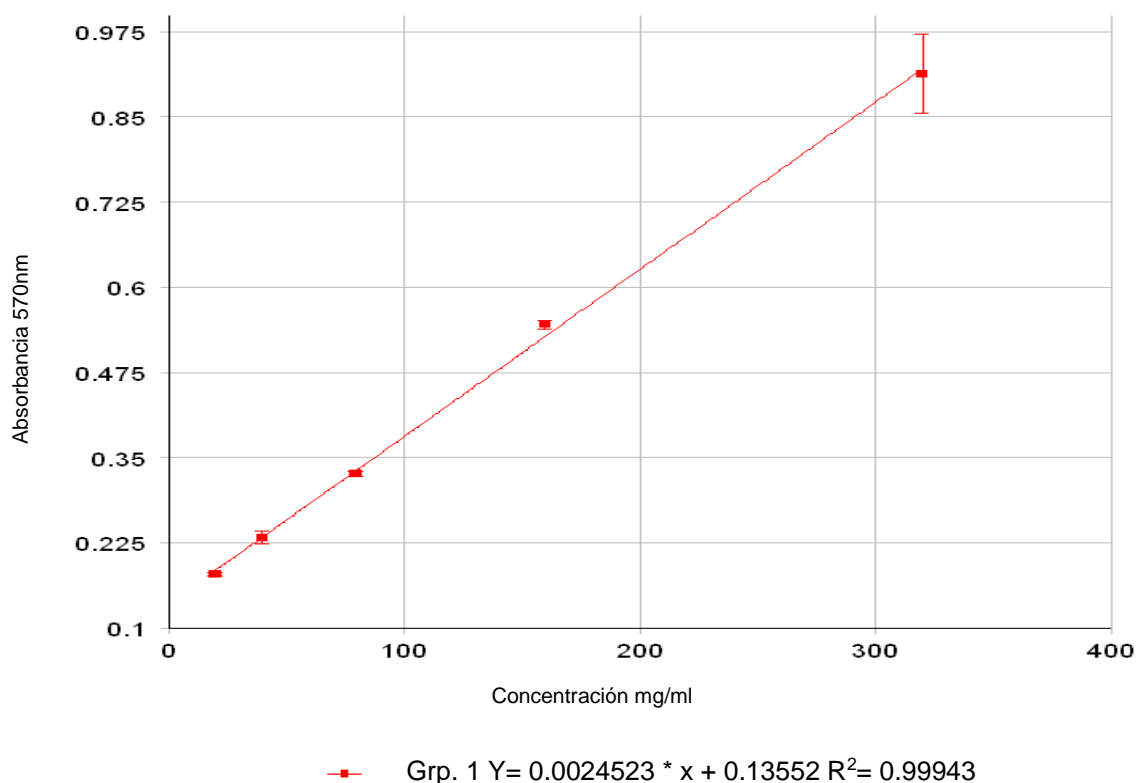
Tabla 4-3: Cuantificación de proteína de los venenos mediante Abs 280

Dilución	Veneno (μl)	PBS (μl)	Ensayo 1 Concentración (mg/mL)	Ensayo 2 Concentración (mg/mL)	Promedio/dilución (mg/mL)
<i>B. rhombeatus</i>					
1:10	50	450	2,16	2,28	2,22
1:15	33.5	466,5	2,32	2,21	2,26
1:20	25	475	2,01	2,18	2,09
1:25	20	480	2,025	2,05	2,03
Promedio			2,12	2,18	2,15
S: Desviación estándar			0,14	0,09	0,11
<i>B. asper</i>					
1:10	50	450	2,17	2,14	2,15
1:15	33.5	466,5	2,04	2,01	2,02
1:20	25	475	1,9	1,95	1,92
1:25	20	480	1,84	1,87	1,85
Promedio			1,98	1,99	1,99
S: Desviación estándar			0,14	0,11	0,13
<i>B. atrox</i>					
1:10	50	450	2,04	1,95	1,99
1:15	33.5	466,5	1,87	1,82	1,84
1:20	25	475	1,72	1,67	1,69
1:25	20	480	1,61	1,59	1,60
Promedio			1,81	1,75	1,79
S: Desviación estándar			0,18	0,15	0,17

### 4.1.1.2 Método del ácido bicinconínico BCA

Las pruebas realizadas tuvieron en cuenta la cuantificación de proteínas de los venenos y antivenenos obtenidas por el método de BCA. Los resultados se consolidaron en la tabla 4-3. En la figura 4-1 se muestra la curva de calibración del método con la línea de tendencia, la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación cercano a 1.

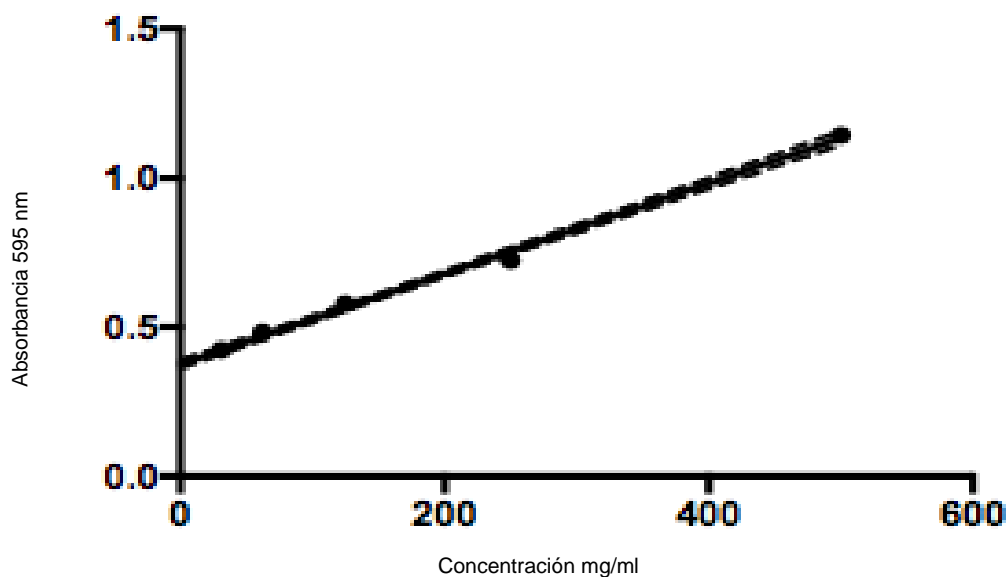
Figura 4-1. Curva de calibración Método BCA



### 4.1.1.3 Método de Bradford

Se obtuvo una curva de calibración para este método. Los resultados se consolidaron en la tabla 4-3. En la figura 4-2 se muestra la curva de calibración del método con la línea de tendencia, la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación cercano a 1.

Figura 4-2: Curva de calibración Método Bradford



$$\text{Grp. 1 } Y = 0.001517 \cdot X + 0.3752 \quad R^2 = 0.9947$$

Se consolidaron los resultados de la cuantificación de las proteínas de los venenos obtenidos por diferentes métodos (Tabla 4-4). Para los posteriores experimentos se utilizó el resultado obtenido por el método de BCA.

Tabla 4-4: Proteína promedio calculada para los venenos por diferentes métodos

Método	Variable	<i>B. rhombeatus</i>	<i>B. asper</i>	<i>B. atrox</i>
	Peso seco (mg)	15	2	3
	PBS reconstitución (mL)	7,6	1	1,5
Absorbancia 280 nm	Cuantificación promedio (mg/mL)	2,15	1,99	1,79
	Desviación estándar	0,11	0,13	0,17
BCA $R^2 = 0.99943$	Cuantificación promedio (mg/mL)	1,8	2,5	1,76
	Desviación estándar	0,07	0,10	0,09
Bradford $R^2 = 0.9947$	Cuantificación promedio (mg/mL)	2	2,10	1,61
	Desviación estándar	0,08	0,09	0,1



El ANOVA arrojó como resultado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los 3 métodos utilizados para la cuantificación de proteína de los venenos. Con un valor de F crítica mayor que F calculada y una  $p$  mayor de 0,05 se aceptó la  $H_0$  de igualdad con un 95% de confianza (tabla 4-5).

Tabla 4-5. ANOVA para los métodos de cuantificación de proteína de los venenos

<i>Grupos</i>		<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Absorbancia 280		6	11,87	1,97	0,02	
BCA		6	12,13	2,02	0,15	
Bradford		6	11,42	1,90	0,07	
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,04	2	0,021	0,25	0,77	3,68
Dentro de los grupos	1,24	15	0,083			
Total	1,29	17				

## 4.1.2. Cuantificación proteica de los antivenenos

### 4.1.2.1. Absorbancia 280 nm

Para los cálculos de cuantificación de proteína se tuvo en cuenta factor de corrección de las inmunoglobulinas (1,4) y la dilución de la muestra. Los resultados se muestran en la tabla 4-6.

### 4.1.2.2. Método del ácido Bicinconínico BCA

La curva de calibración para este método fue la misma para los venenos con  $R^2 = 0.99943$  (figura 4-1). Los resultados de la cuantificación se resumen en la tabla 4-6.

### 4.1.2.3. Método de Bradford

Se obtuvo una curva de calibración de este método para los antivenenos (figura 4-3). Para la determinación de la cuantificación de proteína se utilizó el coeficiente de extinción molar de las inmunoglobulinas G ( $\epsilon = 1.4$ ). Se consignaron los resultados en la tabla 4-6

Figura 4-3: Curva de calibración Bradford para los antivenenos

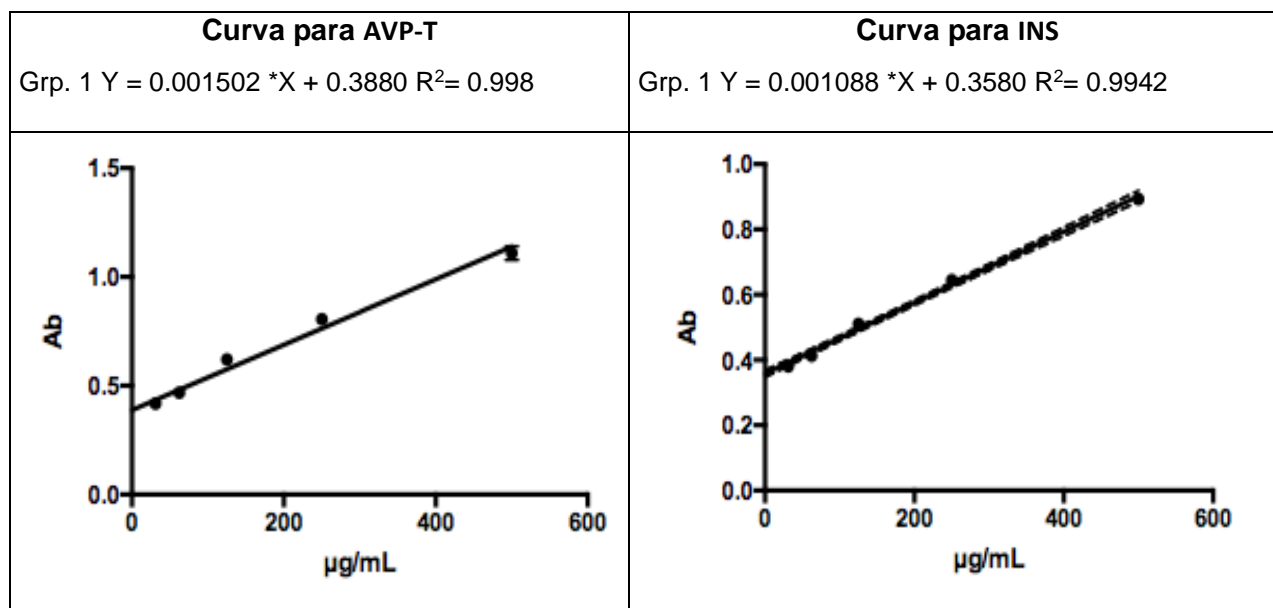


Tabla 4-6: Cuantificación de proteína de los antivenenos por diferentes métodos

		Dilución	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)	Promedio / dilución (mg/ml)	Desviación estándar
<b>Abs 280</b>	INS	1:50	44,3	43,9	44,1	0,28
	AVP-T	1:100	12,6	12,15	12,37	0,31
<b>BCA <math>R^2 = 0.999</math></b>	INS	1:50	44,2	44,8	44,5	0,42
	AVP-T	1:100	11,8	12,3	12	0,35
<b>Bradford</b>	INS $R^2 = 0.9942$	1:100	41,5	43,3	42,4	1,27
		1:200	42,5	44	43,2	1,06
		1:400	42,7	44,2	43,4	1,06
		1:800	43	42,5	43,7	0,35
	Promedio		42,4	44	43,2	
	desviación estándar		0,65	0,50	0,57	
	AVP-T $R^2 = 0.998$	1:15	11,2	12,2	11,7	0,70
		1:20	11,4	12,3	11,85	0,63
		1:25	11,6	12,5	12,05	0,63
		1:30	11,7	12,6	12,15	0,67
	Promedio		11,47	12,4	11,93	
	desviación estándar		0,22	0,18	0,20	

El ANOVA arrojó como resultado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los 3 métodos utilizados para la cuantificación de proteína de los antivenenos. Con un valor de F crítica mayor que F calculada y una  $p$  mayor de 0,05, se aceptó la  $H_0$  de igualdad con un 95% de confianza (tabla 4-7).

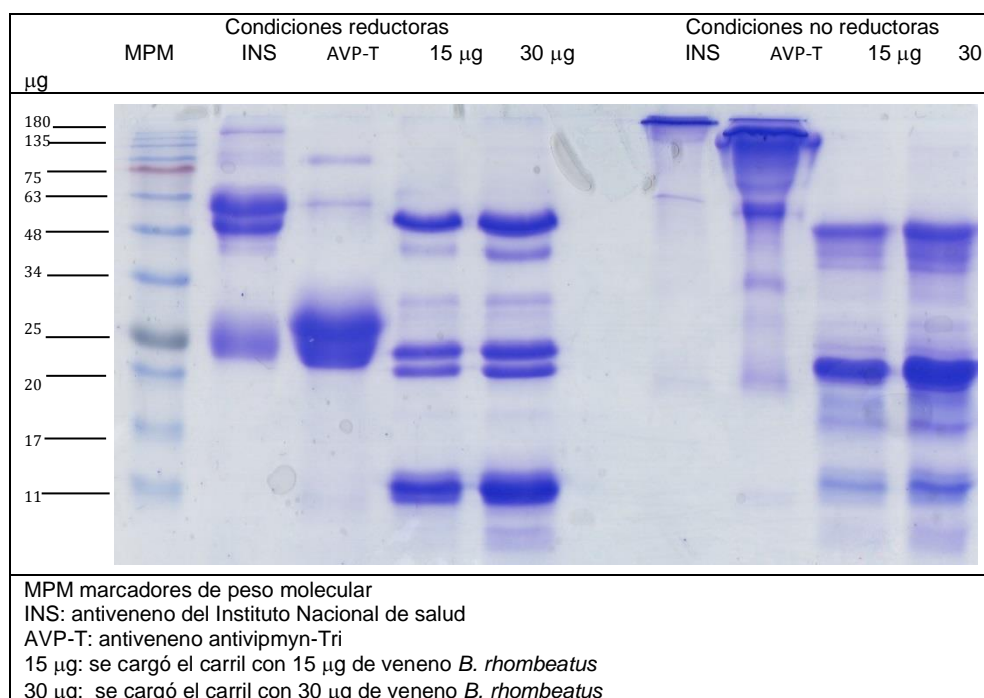
Tabla 4-7: ANOVA para los métodos de cuantificación de proteína de los antivenenos

<b>Grupos</b>	<b>Cuenta</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>		
INS	3	131,8	43,93	0,44		
AVP-T	3	36,27	12,09	0,061		
Absorbancia 280	2	56,47	28,23	503,39		
BCA	2	56,5	28,25	528,12		
Bradford	2	55,1	27,55	489,84		
<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
Antivenenos	1520,99	1	1520,99	8229,76	0,000121	18,51
Métodos	0,63	2	0,31	1,73	0,36	19
Error	0,36	2	0,18			
Total	1522,00	5				

## 4.2 Perfil electroforético de los venenos y antivenenos

En la figura 4-4 se muestra la electroforesis del veneno y de los antivenenos cargando 15  $\mu\text{g}$  en cada carril, el cual fue realizado estratégicamente en conjunto con el fin de optimizar los recursos y comparar los perfiles proteicos.

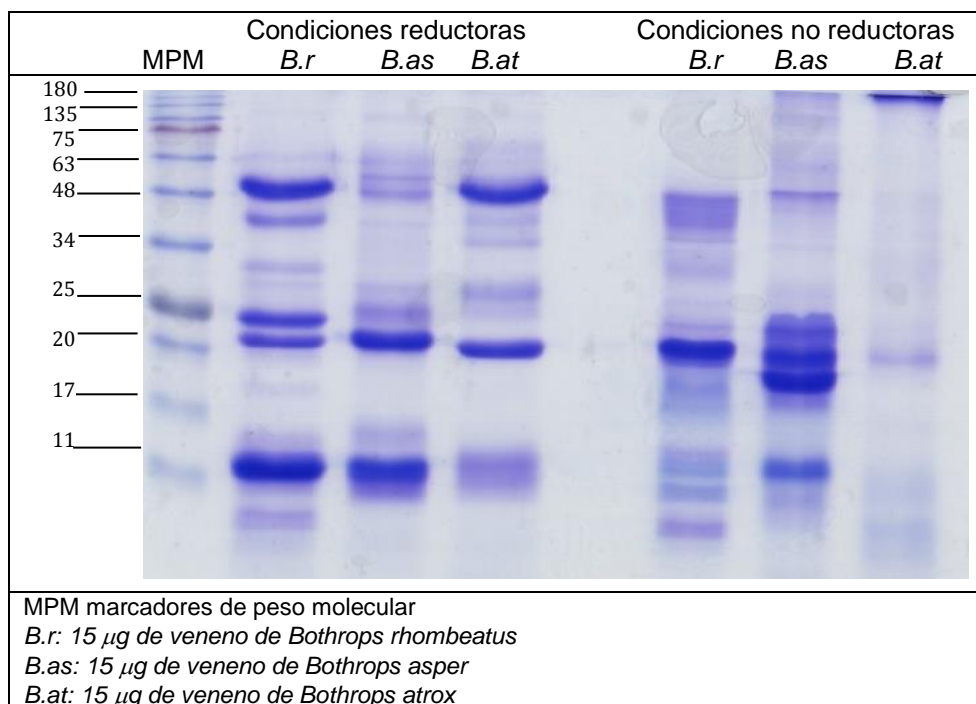
Se realizó el perfil electroforético del veneno *B. rhombeatus* y de los antivenenos INS y AVP-T, donde se observa la concordancia con el peso molecular esperado para los tipos de antivenenos. El antiveneno INS está compuesto de inmunoglobulinas IgG, las cuales en la electroforesis en condiciones reductoras se observa: entre 23 KDa la cadena liviana de IgG (L-IgG) + la cadena liviana de IgGT (L-IgGT), siendo IgGT patognomónica de origen equino; la cadena pesada de IgG (H-IgG) en 48 KDa, la cadena pesada de IgGT (H-IgGT) en 55 KDa, componentes de albúmina alrededor de 70 KDa y una banda alrededor de 170 KDa, no identificada como una fracción de IgG sino posible contaminación (83).

Figura 4-4: Electroforesis del veneno de *B. rhombeatus* y los antivenenos

En la columna del antiveneno AVP-t se encontraron las fracciones digeridas por la pepsina, observándose la cadena L-IgG + L-IgGT entre 22-23 KDa; la cadena H-IgG + H-IgGT alrededor de 30 kDa y una pequeña porción de la cadena H-IgGT en 63 KDa, suponiendo que la digestión con pepsina no fue del 100% (83), además se identificó una banda alrededor de 75 KDa, posiblemente alfa macroglobulina producida durante el proceso de separación; Ambos antivenenos presentaron otros componentes, en el INS se observó una banda de albúmina y posible contaminación, mientras que se identificó alfa macroglobulina en AVP-T, resultados concordantes con lo encontrado por otros autores, donde se ha observado para el INS contaminación por albúmina y agregados de proteína (84).

En la Figura 4-5 se presenta la electroforesis para los venenos de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Al observar el patrón proteico del veneno de *B. rhombeatus* se observaron 8 bandas definidas, entre las cuales las de mayor intensidad se encontraron alrededor de 48, 25, 20 y 11 KDa y de más baja intensidad se observaron alrededor de 63, 45, 34, 30 y 9 KDa. Posiblemente las bandas menores de 10 KDa pueden corresponder con desintegrinas, 11 KDa con PLA<sub>2</sub>, 20 KDa con svMP I, 25 KDa con miotoxina o CRISP, 30 KDa con SP, 45 con svMP II, 50 KDa con svMP III y la de 63 KDa con LAAO.

Figura 4-5 Patrón electroforético de *B. rhombeatus*, *B. asper* y *B. atrox*.



En el patrón proteico de *B. asper* se encontraron aproximadamente 10 bandas, 2 de alta intensidad y bien definidas de 20 y 11 KDa, siendo de menor intensidad las localizadas en 100 KDa, un grupo entre 48-75 KDa y tres bandas en 30, 20 y 15 KDa respectivamente. Para *B. atrox* se pudo observar un patrón electroforético de aproximadamente 8 bandas, siendo las de mayor intensidad las localizadas en 48 y 20 KDa y las de menor intensidad alrededor de 75, 40, 34, 30, 28 y 11 KDa.

A nivel general en los perfiles analizados de las 3 especies son similares, con componentes proteicos de alto, medio y bajo peso molecular. Las bandas entre 50-70 KDa pueden corresponder a proteínas con peso esperado para las svMP III, las bandas observadas alrededor de 20-25 KDa puede corresponder a svMP I, mientras que las bandas entre 11-15K Da pueden corresponder a PLA<sub>2</sub>. El perfil electroforético de *B. rhombeatus* es muy similar a los encontrados para el veneno de *B. asper* (44,64), donde de 13-15 KDa pueden corresponder a PLA<sub>2</sub> observadas en todas las electroforesis, las fracciones de 20-25 pueden corresponder a svMP I y las que se encuentran alrededor de 45-48 KDa a svMP III, acorde con lo encontrado por diversos autores para *B. asper* (36).

## 4.3 Separación de las fracciones de los venenos

### 4.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Las figuras 4-6 y 4-7 pertenecen a los cromatogramas para el veneno de *B. rhombeatus*, los cuales se observan similares en cuanto a las fracciones eluidas, sin embargo, hay que tener en cuenta que no se pueden comparar directamente debido a la diferencia en la medida de la abundancia y el tiempo de corrida, siendo de 90 minutos en el IBT, mientras que en el IBUN el protocolo de corrida son 180 minutos. A continuación, en la tabla 4-8 se comparan las posibles componentes del veneno según el tiempo de elución (36,44,64).

Tabla 4-8: Compuestos posibles de las fracciones según el tiempo de elución.

Tiempo de corrida		Posibles compuestos de las fracciones
IBT	IBUN	
5-10	10-20	compuestos de alta polaridad, péptidos de bajo peso molecular y nucleótidos
25-30	50-60	proteínas pequeñas como inhibidores de proteasa tipo Kunitz
55-70	100-140	proteínas de tamaño medio como las CRISP, PLA <sub>2</sub> , SP
75-90	140-180	proteínas grandes o más hidrofóbicas como svMP

Figura 4-6: Cromatograma del veneno completo de *Bothrops rhombeatus*, protocolo IBT

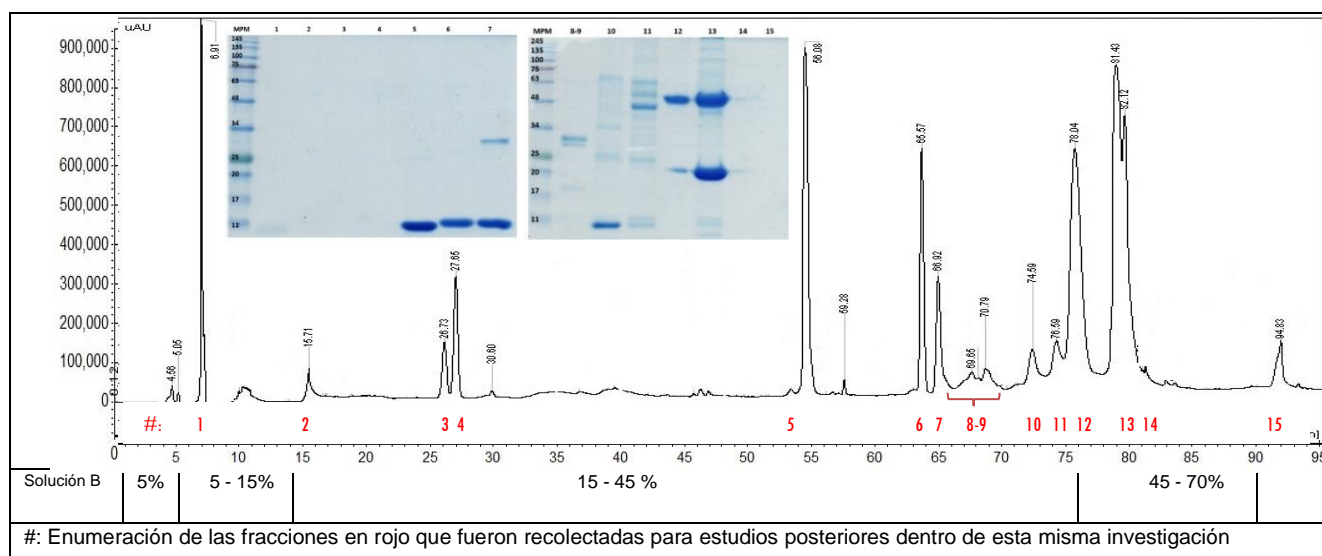
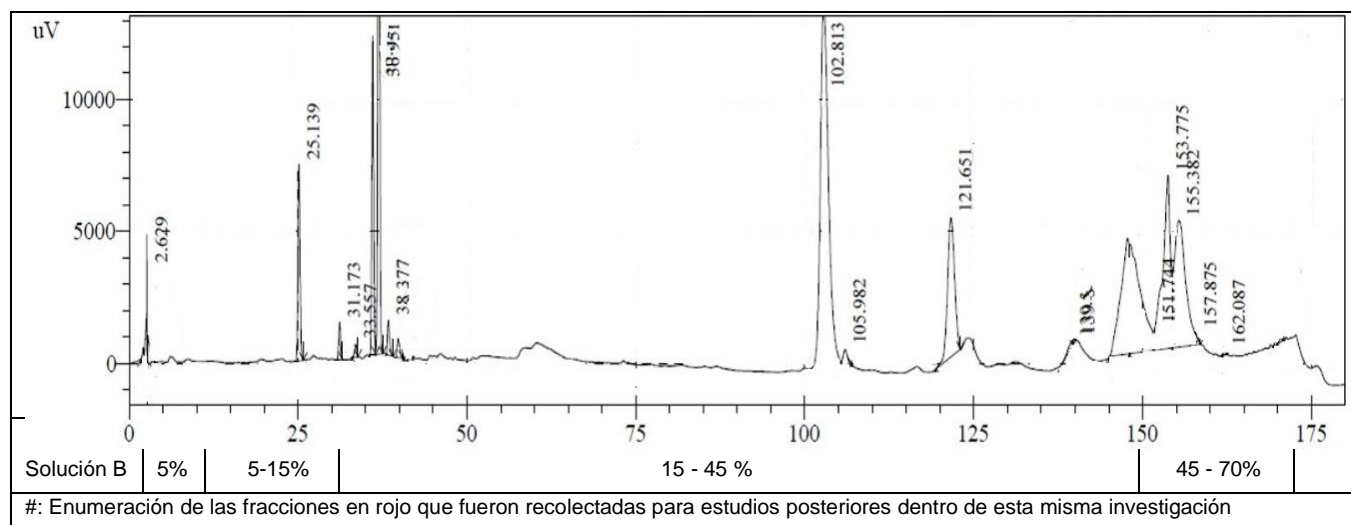


Figura 4-7: Cromatograma del veneno completo de *Bothrops rhombeatus*, protocolo IBUN

Teniendo en cuenta que el veneno de *B. rhombeatus* no está caracterizado en Colombia, en la literatura no se encontró un perfil para este veneno, por lo tanto, se comparó el perfil cromatográfico con el de la especie *Bothrops asper* y *B. atrox* (figura 4-8 y 4-9 respectivamente).

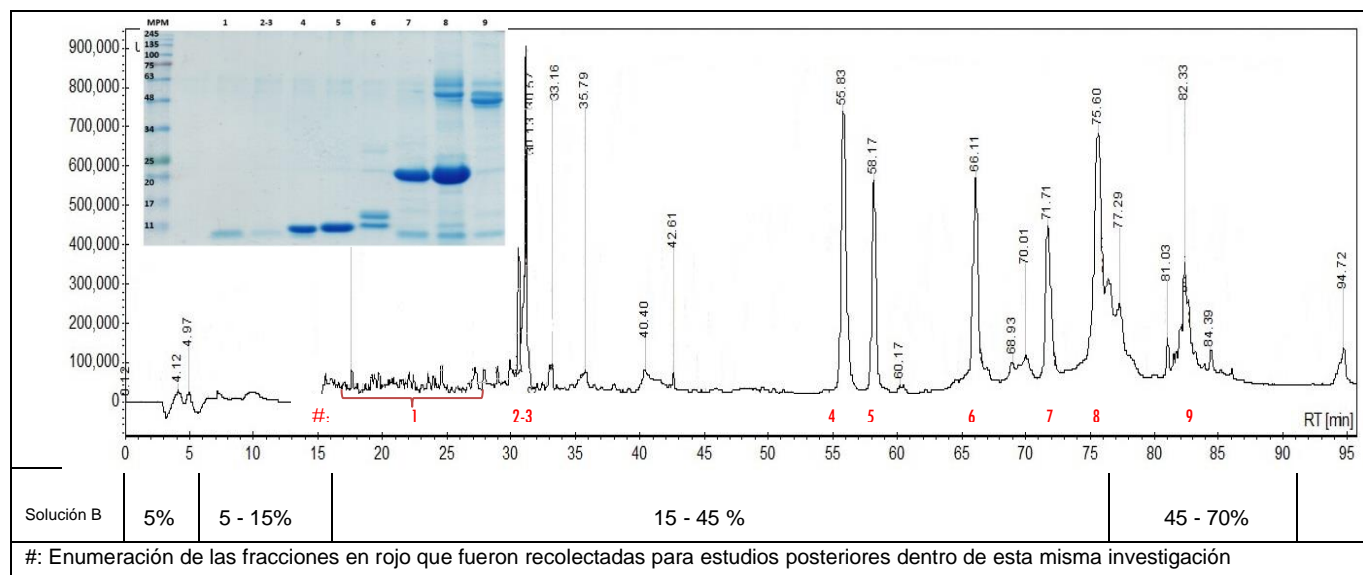
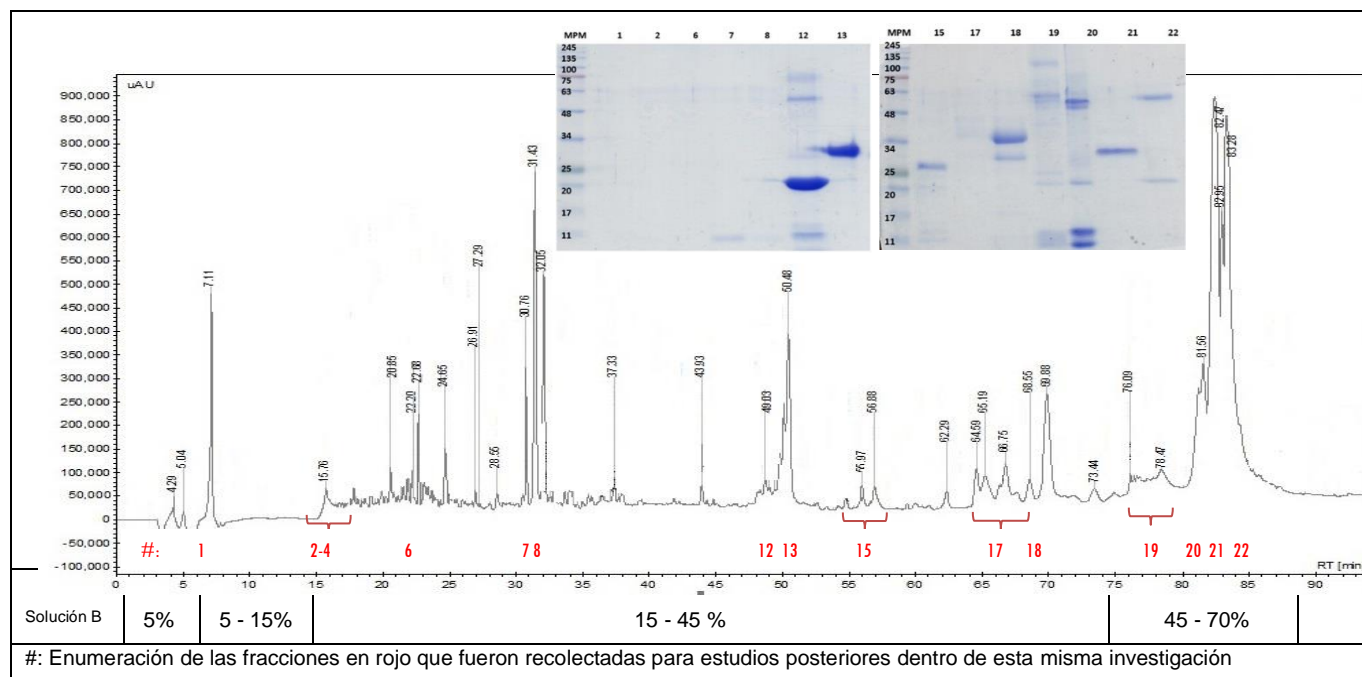
Figura 4-8: Cromatograma del veneno completo de *Bothrops asper*, protocolo IBT

Figura 4-9: Cromatograma del veneno completo de *Bothrops atrox*, protocolo IBT

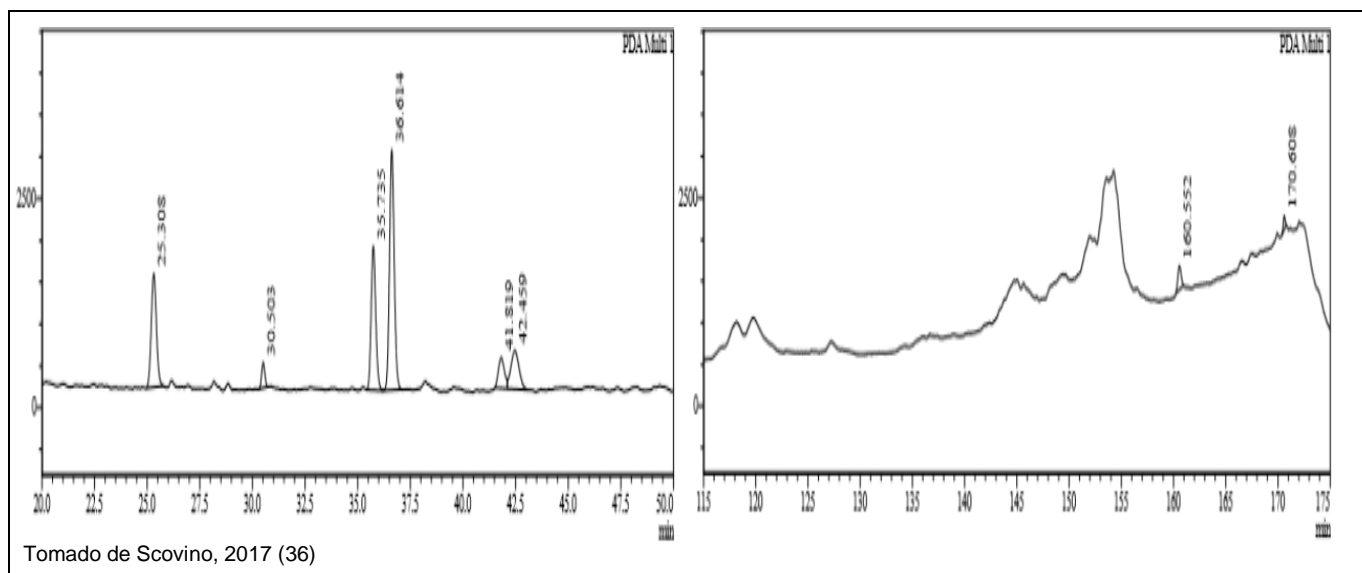
En los cromatogramas de los tres venenos se observó a nivel general fracciones entre los primeros 5-10 minutos que podrían corresponder a compuestos de alta polaridad, péptidos de bajo peso molecular y nucleótidos, seguido de picos entre 25–30 minutos posiblemente proteínas pequeñas como inhibidores de tipo Kunitz. Entre los minutos 55-70 los picos posiblemente corresponden a proteínas de tamaño medio como las CRISP, PLA<sub>2</sub>, SP y entre los minutos 75-95 proteínas grandes o más hidrofóbicas como lo son svMP, LAAO. Se observó mayor similitud entre el veneno de *B. rhombeatus* y *B. asper* teniendo en cuenta coincidencias en los tiempos de las fracciones y en abundancia, mientras que en el veneno de *B. atrox* no se observó la misma abundancia de las fracciones entre los minutos 50-75. Al minuto 75 el veneno de *B. rhombeatus* y *B. atrox* presentaron una fracción similar abundante.

En la literatura se encontraron similitudes de las proteínas y su abundancia entre los venenos de *B. asper* de la región Pacífica en los picos presentados en los primeros 40 min, 110 min 140-160 min, con diferencias mínimas en su abundancia (44,64). El perfil cromatográfico más similar es el encontrado por Scovino, probablemente debido a que se utilizó el protocolo estandarizado del IBUN, aunque para mejor visualización su



metodología fue generar cromatogramas por secciones de tiempo (36), en la figura 4-10 se observan dos cromatogramas de 20-50 min y de 115-175 min (Figura 4-10). De la misma forma se encontraron similitudes con el trabajo realizado por Mora-Obando y colaboradores (85), quienes compararon el veneno de *B. ayerbei* con *B. asper* del cauca.

Figura 4-10: Perfil cromatográfico de *B. asper* encontrado por Scovino



#### 4.3.2. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones del veneno

Para la realización de los geles se tuvo en cuenta las fracciones recolectadas señaladas con números rojos en la parte inferior del cromatograma, el volumen de resuspensión, su concentración por Abs 280 nm y la cantidad de veneno contenido en la muestra para que aproximadamente cada carril tuviera 10 µg de veneno, se observan las cantidades para el veneno de *B. rhombeatus*, *B. atrox* y *B. asper* en las Tablas 4-9, 4-10 y 4-11 respectivamente. Los geles correspondientes se presentan junto con el perfil cromatográfico de cada veneno (Figuras 4-6, 4-8, 4-9).

De las fracciones obtenidas del veneno de *B. rhombeatus* se observaron bandas proteicas entre los carriles 5-13. En los carriles del 5-7 se encontraron bandas con peso de 11 KDa, además en el carril 7 y 8 bandas con peso alrededor de 34 KDa, en los carriles 10 y 11 bandas similares con pesos de 63,48,34,25,11 KDa pero de leve intensidad, mientras que

en los carriles 12 y 13 bandas gruesas de alta intensidad entre 48-50 y 25 KDa. De esta manera se podría suponer que en el veneno de *B. rhombeatus* se observa mayor abundancia de svMP III, I y PLA<sub>2</sub>.

En el perfil de *B. asper* en los carriles del 2-9 se observaron bandas con peso alrededor de 11 KDa y algunas de intensidad leve alrededor de 63 KDa. En los carriles 7 y 8 se presentan bandas gruesas bien definidas alrededor de 20-25 KDa, además bandas de intensidad leve entre 48-63 y 11 KDa, las cuales también se presentan en el carril 9.

Para *B. atrox* se observan proteínas entre el carril 12-22. En el carril 12 se observan bandas de 75, 63,15 y 11 KDa bien definidas, acompañadas de una banda gruesa entre 20 y 25 KDa. En la columna 13 se observa una gran banda entre 30-34KDa, similar a la observada en la columna 18, sin embargo, en ésta última las bandas están más definidas. En las columnas 15 y 21 se observa una banda leve alrededor de 25 KDa. En los carriles 19 y 20 se observan bandas entre 48-63 KDa, 20-25 KDa y 11-15 KDa, mientras que en el 22 se observan bandas leves en 48 y 20 KDa.

A nivel general en los perfiles analizados de los tres venenos se observaron componentes proteicos de alto, medio y bajo peso molecular, cada una de las cuales puede tener diferentes mecanismos de acción dentro de un organismo. Las bandas entre 50-70 KDa pueden corresponder a proteínas con peso esperado para las svMP III, mientras que las bandas alrededor de 30-35 KDa pueden coincidir con las de tipo trombina. Las bandas observadas alrededor de 20-25 KDa puede corresponder a svMP I, mientras que las bandas entre 11-15 KDa pueden corresponder a PLA<sub>2</sub>.

De esta manera puede corresponder que el veneno de *B. rombeathus* presenta mayor abundancia de svMP III, I y PLA<sub>2</sub>, mientras que para *B. asper* y *B. atrox*, aunque también presentan un perfil proteico similar se observa ligera disminución de concentración svMP III y trombin like en el patrón de *B. atrox*.

Tabla 4-9: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de *B rhombeatus*

# tubo	Fracción en el cromatograma	Volumen de resuspension $\mu$ l	Concentración A280	Volumen de veneno $\mu$ l	Volumen H2O ml	Cantidad de proteína $\mu$ g
1	1	10	1,00	8	8,00	8,00
2	2	10	0,66	8	8,00	5,28
3	3	10	1,20	8,33	8,00	10,00
4	4	20	1,34	7,46	8,50	10,00
5	5	30	2,66	3,75	12,25	9,98
6	6	20	1,83	5,46	10,54	9,99
7	7	15	1,02	9,8	6,20	10,00
8+9.	89.	10	0,87	8	8,00	6,96
10	10	10	0,42	8	8,00	3,36
11	11	10	0,23	8	8,00	1,84
13	13	30	2,31	4,33	11,68	10,00
14	14	30	0,24	8	8,00	1,92
15	15	10	0,78	8	8,00	6,24

Tabla 4-10: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de *B atrox*

# tubo	Fracción en el cromatograma	Volumen de Resuspensión $\mu$ l	Concentración A280	Volumen de veneno $\mu$ l	Volumen H2O $\mu$ l	Cantidad de proteína $\mu$ g
1	1	20	0,71	14,08	2,00	10,00
2+4.	2-4.	10	0,26	38,46	8,00	10,00
6	6	10	0,50	20,00	8,00	10,00
7	7	10	1,04	9,62	6,40	10,00
8	8	20	1,94	5,15	10,85	10,00
12	12	15	0,86	11,63	3,00	10,00
13	13	20	0,42	23,81	0,00	10,00
15	15	10	0,53	18,87	8,00	10,00
17	7	10	0,20	50,00	8,00	10,00
18	8	20	0,60	16,67	0,00	10,00
19	19	10	0,31	32,26	8,00	10,00
20	20	10	1,05	9,52	6,00	10,00
21	21	30	0,10	100,00	0,00	10,00
22	22	30	0,68	14,71	2,00	10,00

Tabla 4-11: Volúmenes utilizados en SDS-PAGE para fracciones de *B asper*

# tubo	Fracción en el cromatograma	Volumen de Resuspensión $\mu$ l	Concentración A280	Volumen de veneno $\mu$ l	Volumen H <sub>2</sub> O ml	Cantidad de proteína $\mu$ g
15+16.	1	10	0,28	35,71	8,00	10,00
24	2	10	0,40	25,00	4,00	10,00
25	3	10	1,03	9,71	6,30	10,00
28	4	15	2,52	3,97	12,00	10,00
29	5	10	2,18	4,59	11,42	10,00
30	6	15	2,32	4,31	11,70	10,00
32	7	10	0,17	58,82	8,00	10,00
34	8	10	0,18	55,56	8,00	10,00
39	9	10	0,66	15,15	8,00	10,00

## 4.4. Afinidad inmunoquímica antiveneno- veneno

### 4.4.1. ELISA

En este trabajo se expresó el nivel de reconocimiento como título, definido como la concentración ( $\mu$ g/mL) de antiveneno necesario para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (medida como Abs 405 nm). Se realizó la curva de calibración del método y se desarrollaron réplicas por separado con lecturas a los 30 minutos.

Figura 4-11. Curva de calibración de ELISA para cada antiveneno

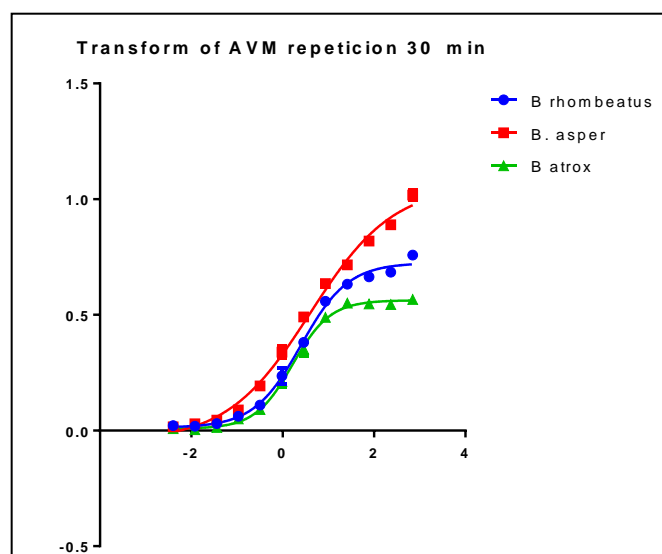
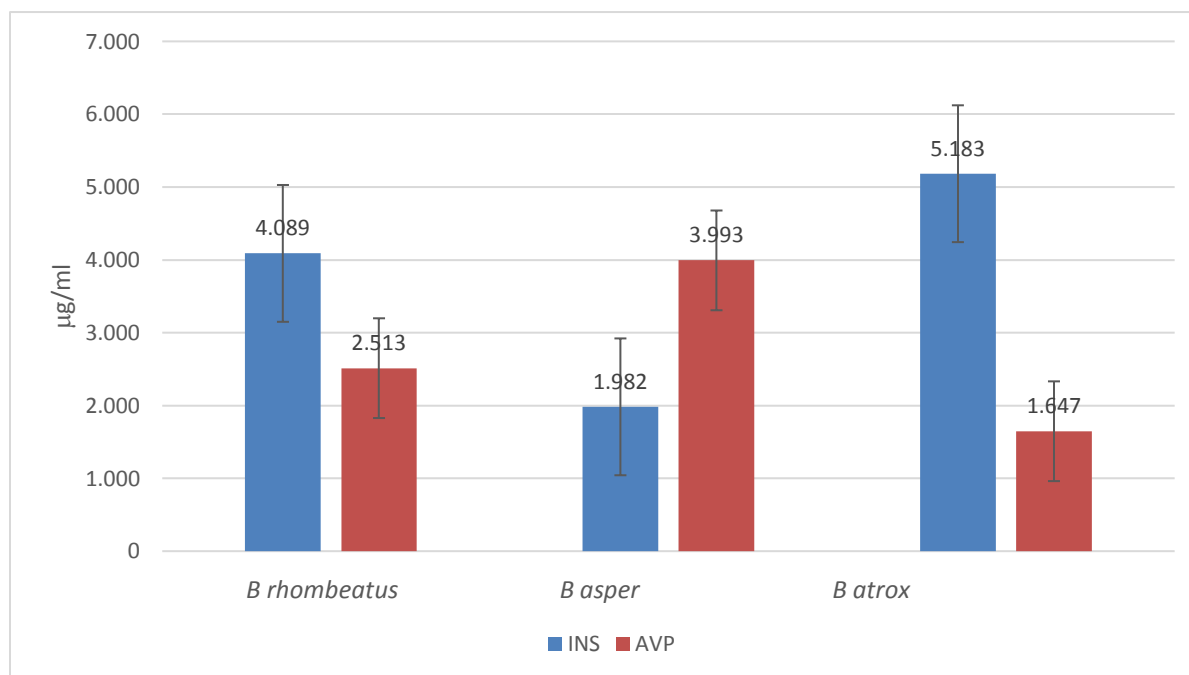


Tabla 4-12. Reconocimiento por ELISA del INS y AVP-T hacia los venenos

	INS		AVP-T	
	Títulos μg/mL	Intervalo de confianza 95%	Títulos μg/mL	Intervalo de confianza 95%
<i>B. rhombeatus</i>	4.089	3.633-4.602	2.513	2.097-3.011
<i>B. asper</i>	1.982	1.830-2.147	3.993	2.743-5.812
<i>B atrox</i>	5.183	4.228-6.352	1.647	1.441-1.883

Título: Nivel de reconocimiento por ELISA, expresado como la concentración de antiveneno (μg/ml) necesaria para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (Abs 405 nm).  
 AVP-T: antiveneno Antivipmyn-Tri  
 INS: antiveneno del Instituto Nacional de salud

Figura 4-12: Reconocimiento por ELISA del INS y AVP-T hacia los venenos



Los ensayos de ELISA mostraron que se requirió mayor concentración de antiveneno INS para alcanzar la mitad de la respuesta máxima de reconocimiento al veneno de *B. rhombeatus*, comparado con el antiveneno AVP-T. El INS reconoció mejor el veneno de *B. asper* mexicano, pero requirió mayor concentración para reconocer los componentes del veneno de *B. atrox*.

El antiveneno AVP-T necesitó menor concentración para reconocer los componentes del veneno de *B atrox*, seguido del veneno de *B rhombeatus* y por último de *B asper* (Tabla 4-12 y Figura 4-12). Estos resultados son concordantes con lo encontrado por Neri (82), quien en ensayos de ELISA, mostró que se requirió mayor cantidad de AVP-T para reconocer los componentes proteicos del veneno de *B. asper*, el cual se utilizó como control de su experimento.

Hay que recordar que en este experimento se utilizó veneno completo y que ninguno de los antivenenos fue elaborado con veneno de *B. rhombeatus*, por lo que se infiere que existe reconocimiento cruzado con algunas fracciones similares de los venenos. En esta investigación fue evidente que se encontrara un mejor reconocimiento del AVP-T hacia el veneno de *B atrox* dado que ambos son mexicanos, sin embargo, fue paradójico encontrar mayor reactividad cruzada de AVP-T hacia el veneno de *B. rhombeatus*, al igual que la reactividad cruzada observada del INS hacia el veneno de *B. asper*. Teniendo en cuenta que no conocemos los venenos específicos con los que fueron elaborados los antivenenos en estudio, por el momento no podemos concluir sobre las fracciones similares a las cuales se hace reconocimiento cruzado entre los antivenenos y los venenos. Además, basado en este análisis se explica lo observado en los ensayos de capacidad neutralizante, dado que ambos antivenenos pudieron neutralizar la dosis de veneno retada.

El análisis estadístico con ANOVA mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los antivenenos, respecto a la cantidad requerido de cada uno para alcanzar la mitad de la respuesta máxima de reconocimiento hacia los venenos, haciendo el análisis por bloque de acuerdo con cada veneno. Con un valor de F calculado mayor que la F crítica y una p menor de 0,05 se rechazó la hipótesis de igualdad con un 95% de confianza.

Estos resultados indican que, a pesar del reconocimiento inmunoquímico observado, en la práctica clínica se requieren cantidades diferentes de ambos antiveneno para lograr el 50% del reconocimiento de un veneno específico, confirmando el hecho de que 1 vial de antiveneno no reconoce la misma cantidad de veneno para todo un género como lo detallan actualmente los insertos de los medicamentos en cuestión y además, se hace indiscutible la necesidad de promover antivenenos específicos para las regiones, dado que debería existir mayor reconocimiento directo que por reactividad cruzada.

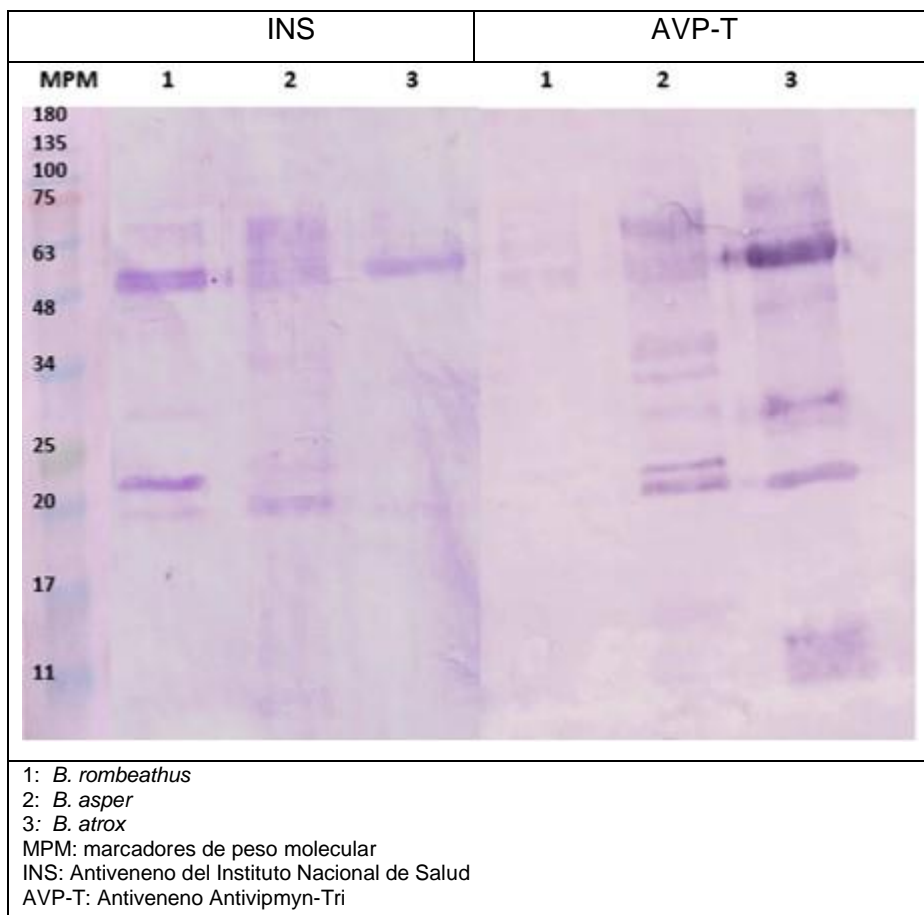
Tabla 4-13: ANOVA para los resultados de ELISA de los antivenenos

RESUMEN	INS	AVP-T	Total			
<i>B. rhombeatus</i>						
Cuenta	2	2	4			
Suma	8,289	4,993	13,282			
Promedio	4,1445	2,4965	3,3205			
Varianza	0,0061605	0,0005445	0,90753633			
<i>B. asper</i>						
Cuenta	2	2	4			
Suma	3,852	7,997	11,849			
Promedio	1,926	3,9985	2,96225			
Varianza	0,006272	6,05E-05	1,43386292			
<i>B. atrox</i>						
Cuenta	2	2	4			
Suma	10,34	3,327	13,667			
Promedio	5,17	1,6635	3,41675			
Varianza	0,000338	0,0005445	4,09880825			
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Venenos	0,45	2	0,22	98,90	2,551E-05	5,14
Antivenenos	3,16	1	3,16	1364,75	2,625E-08	5,98
Interacción	16,14	2	8,07	3478,54	6,398E-10	5,14
Dentro del grupo	0,01	6	0,002			
Total	19,77	11				

#### 4.4.2. Western Blot

Para este experimento se sembraron 4 µg de veneno completo por carril y los antivenenos se utilizaron a una concentración de 200 µg/ml. Se observó el reconocimiento inmunoquímico de los antivenenos INS y AVP-T hacia los componentes proteicos del veneno de *B. rhombeatus*, se utilizaron los venenos de *B. asper* y *B. atrox* como controles.

Figura 4-13: Reconocimiento por Western Blot del INS y AVP-T hacia los venenos



Estos resultados muestran el posible reconocimiento de las fracciones proteicas de los venenos a través de la ubicación de las bandas. Para el antiveneno AVP-T reconoció fracciones de los tres venenos, teniendo más bajo reconocimiento hacia el veneno de *B. rhombeatus* con bandas de baja intensidad alrededor de 50 KDa para svMP III, con el veneno de *B. asper* se observaron bandas definidas entre 20 a 75 KDa posiblemente svMP I y III, mientras que con el veneno *B. atrox* se observó mejor reconocimiento alrededor de 48-50 KDa y otras bandas en 75, 35, 25, 20 y 11 KDa, posiblemente svMP III, I y PLA<sub>2</sub> respectivamente. A nivel general AVP-T presentó un mejor reconocimiento para la mayoría de las fracciones de los venenos de *B. asper* y de *B. atrox*, comparado con INS. Estos resultados se muestran similares a los obtenidos por Neri (82) quien a través de ensayos de Western Blot, mostró reconocimiento del antiveneno AVP-T hacia el veneno de *B. asper* con bandas de alrededor de 25 y 50 KDa.



Se observó que el antiveneno del INS también reconoció componentes proteicos de los 3 venenos, con menor número de bandas y ubicadas entre 25 y 50 KDa generalmente. Hacia el veneno de *B. rhombeatus* se observó reconocimiento de las bandas 48 y 25 KDa posiblemente svMP III y I respectivamente, hacia el veneno de *B. asper* se observó reconocimiento de las mismas bandas, pero con menor intensidad, mientras que para el veneno de *B. atrox* se observó solo el reconocimiento de una banda de aproximadamente 50 kDa posiblemente svMP III.

Al comparar los resultados de este experimento con los obtenidos en los ensayos de ELISA, se puede inferir que, aunque el INS requiera mayor cantidad de antiveneno para tener un nivel de reconocimiento al 50%, se une a las fracciones svMP I y III del veneno de *B. rhombeatus*, mientras que AVP-T, aunque requiere menos antiveneno para establecer reconocimiento, se une con menor intensidad a la fracción svMP III del mismo veneno. Estos resultados se pueden explicar debido a la falta de especificidad de ambos antivenenos a los componentes del veneno *B. rhombeatus*.

Comparado con *B. asper* ambos antivenenos fueron similares en cuanto al reconocimiento de svMP III y I, dado que en los resultados de ELISA se encontró diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de antiveneno requerido, se deduce que estos antivenenos fueron elaborados en parte con veneno de *B. asper*; Se ha observado en otros estudios que ésta es una especie que presenta similitudes en la composición de su veneno, a pesar de la variabilidad especie-específica y la observada en algunas regiones (64). A nivel general AVP-T reconoció más fracciones del veneno de *B. asper* y *B. atrox* comparado con INS, incluyendo el reconocimiento de bandas alrededor de 11 KDa, posiblemente PLA<sub>2</sub> de *B. atrox*, no reconocido por INS.

#### 4.4.3. Cromatografía de Afinidad

Se encontró que ambos antivenenos se acoplaron efectivamente a las fracciones aisladas de los venenos de *B. rhombeatus* y *B. asper*. El INS se acopló a las fracciones del veneno de *B. rhombeatus* en un 94,2%, comparado con el AVP-T quien se acopló al 90,4%. Para el veneno de *B. asper* como control, el INS tuvo un 92,7% de acoplamiento mientras que AVP-T un 96,6%.

Tabla 4-14: Cuantificación del acoplamiento del INS y AVP-T hacia los venenos

	INS			AVP-T		
	Veneno no unido (mg)	Veneno unido (mg)	Porcentaje acoplamiento %	Veneno no unido (mg)	Veneno unido (mg)	Porcentaje acoplamiento %
<i>B. rhombeatus</i>	2,2	37,7	94,2	3,5	32,5	90,4
<i>B. asper</i>	2,9	37,1	92,7	1,2	34,8	96,6

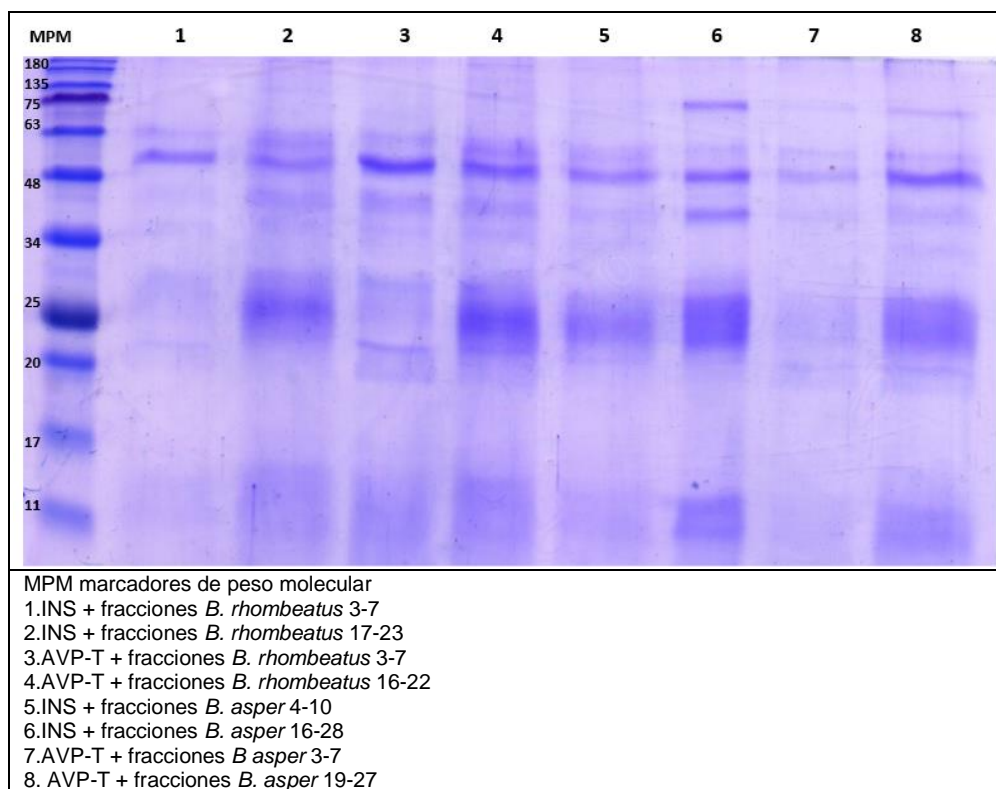
Lo que se puede analizar de la cromatografía de afinidad y teniendo en cuenta los anteriores resultados, al parecer los antivenenos son altamente afines por algunas fracciones de los venenos, pero se unen por efecto de la reactividad cruzada y al no tener alta especificidad se requiere una gran cantidad de antiveneno para su acoplamiento y reconocimiento inmunoquímico. Teniendo en cuenta que solo se realizó un experimento de cromatografía de afinidad por su alto costo, no se lograron obtener réplicas del ensayo para comparar la reproducibilidad en los resultados y por lo tanto realizar un análisis estadístico no tendría la validez suficiente.

Los resultados de la cromatografía de afinidad inmunoquímica presentados se pueden correlacionar con la investigación realizada por Neri (82), quien evaluó el reconocimiento inmunoquímico de venenos de serpientes norteamericanas por AVP-T y CroFab; Éste último es un antiveneno de origen ovino producido por laboratorios Wyeth, en cuya investigación también utilizaron veneno de *B. asper* como control. Los resultados de Neri muestran que AVP-T tuvo 34,5% de afinidad inespecífica al veneno de *B. asper* y 65% de afinidad específica, similar a lo obtenido en este estudio, donde se encontró un 96,6% de acoplamiento a los componentes proteicos del veneno de *B. asper*.

#### 4.3.1.1 Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones acopladas

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE para observar las bandas de los antivenenos acoplados a las fracciones de los venenos (Figura 4-14). Se encontró reconocimiento de las fracciones proteicas del veneno de *B. rhombeatus* y *B. asper* con ambos antivenenos, posiblemente a través del reconocimiento heterólogo dado que muchas fracciones de los venenos son similares entre las especies.

Figura 4-14: Electroforesis de las fracciones Ag-Ac acopladas



Al observar las columnas 1 a 4 correspondientes a las fracciones del veneno de *B. rhombeatus* se observó mejor acoplamiento de las fracciones proteicas al antiveneno AVP-T comparado con INS. Ambos antivenenos se acoplaron acoplados a svMP I, svMP II con bandas definidas, mientras que para PLA<sub>2</sub> se observó mejor señal de acoplamiento con AVP-T. Estos resultados sugieren una alta afinidad de los dos antivenenos a las svMP I y II de *B. rhombeatus*, probablemente teniendo en cuenta la reactividad cruzada y la cantidad de estas fracciones en el veneno. Para el veneno de *B. asper* se observó mejor acoplamiento para la mayoría de las fracciones proteicas con ambos antivenenos. A continuación, se muestra una asociación de las fracciones posiblemente reconocidas por los antivenenos de acuerdo con el nivel de intensidad de las bandas observadas en la electroforesis (Tabla 4-15).

Tabla 4-15: Asociación del posible reconocimiento inmunoquímico de los antivenenos

Cromatografía tiempo (min)		Bandas en Electroforesis (KDa)	Posibles compuestos de las fracciones	Reconocimiento electroforético por AVP-T (intensidad)	Reconocimiento electroforético por INS (intensidad)
IBT	IBUN				
55-70	100-140	10-15	PLA <sub>2</sub> ,	Intermedio	Intermedio
55-70	100-140	20-25	CRISP	Leve	Leve
75-90	140-150	20-25	svMP I	Alta	Alta
75-90	140-180	25	SP	Alta	Leve
75-90	140-180	48-55	svMP II	Alta	Alta
75-90	140-180	60-90	svMP III	Alta	

Sintetizando los resultados de los ensayos inmunoquímicos, el INS reconoció las fracciones svMP I y III del veneno de *B. rhombeatus*, se acopló en un 94% del veneno utilizado, pero requirió mayor cantidad de antiveneno para tener el 50% del reconocimiento inmunoquímico, lo cual, sumado a los resultados de la electroforesis de las fracciones acopladas, se hipotetiza una baja especificidad hacia las mismas.

De la misma forma, AVP-T reconoció fracciones de svMP III del veneno de *B. rhombeatus*, se acopló en un 90% del veneno utilizado y aunque requirió menor cantidad de antiveneno para tener el 50% del reconocimiento y mostró más fracciones acopladas en la electroforesis posterior a la cromatografía de afinidad, igualmente presenta baja especificidad al veneno de *B. rhombeatus*. Cabe recordar que ambos antivenenos presentaron acoplamiento por reactividad cruzada, dado que ninguno fue elaborado con veneno de *B. rhombeatus* y reconocieron pocas fracciones del veneno, las cuales no necesariamente siempre son las que presentan mayor efecto clínico o severidad en la ofidiotoxicosis, por lo que no se puede concluir con certeza cuál antiveneno es mejor para contrarrestar los efectos clínicos del veneno de *B. rhombeatus* y se hace necesario realizar la caracterización toxicológica completa para este veneno.

## 4.5 Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)

Para *B. rhombeatus* se encontró una DL<sub>50</sub> por vía IV de 105.3 µg /ratón CD1 con un intervalo de confianza de 93.2-119.5 ( $R^2 = 0.98$ ). Por vía IP se encontró una DL<sub>50</sub> de 132.7 µg /ratón CD1 con un intervalo de confianza (IC) de 119.9-146.9 ( $R^2 = 0.97$ ). En la figura 4-15 se grafica la DL<sub>50</sub> IP para el veneno de *B. rhombeatus*.

Figura 4-15: Curva dosis respuesta DL<sub>50</sub> Intraperitoneal *B. rhombeatus*

### DL<sub>50</sub> intraperitoneal del veneno de *Bothrops rhombeatus*

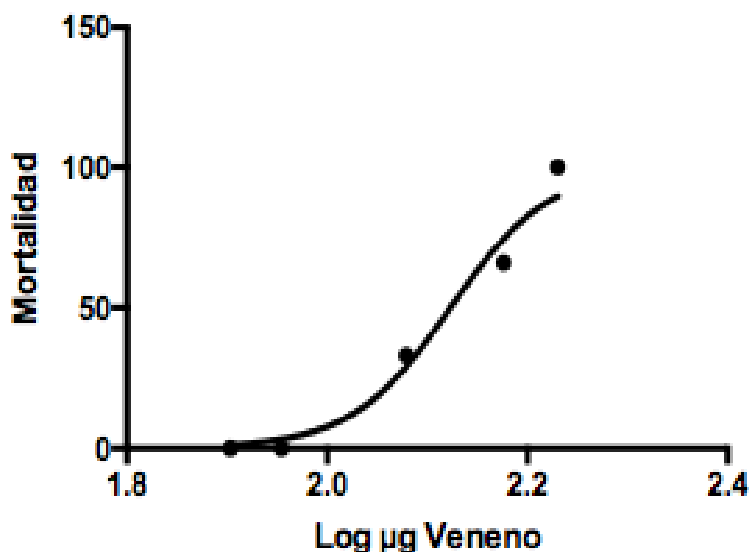


Tabla 4-16: Comparación de DL<sub>50</sub> de los venenos

Veneno	Vía de inoculación	DL <sub>50</sub> µg/ratón CD1	DL <sub>50</sub> mg/kg	R <sup>2</sup>	IC
<i>B. rhombeatus</i>	IV	105,3	5,2	0.98	93,2 – 119,5
	IP	132,7	6,6	0.97	119,9 – 146,9
<i>B. asper</i>	IP	128,1	6,4	0.97	120,9 - 135,7
<i>B. atrox</i>	IP	134,7	6,7	0.95	121,9 - 148,8

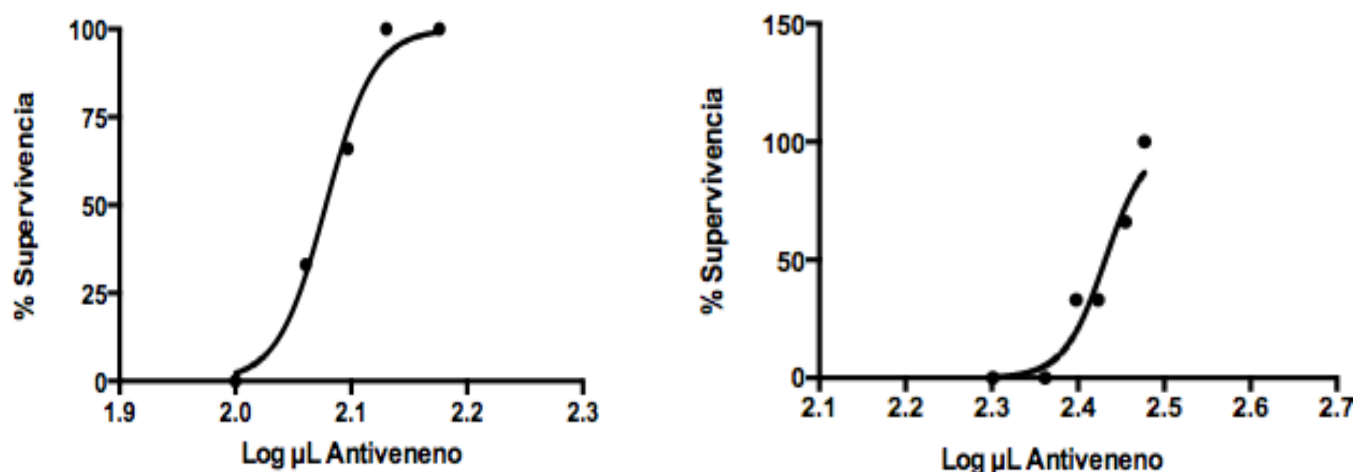
DL<sub>50</sub> µg /ratón: microgramos de veneno necesarios para matar al 50% de ratones experimentales (CD1, 20g)  
DL<sub>50</sub> mg/kg: miligramos de veneno letales por kilogramo de peso  
IC: Intervalo de confianza  
IP: Intraperitoneal  
IV: intravenoso

No se encontró diferencia significativa entre las Dosis Letales Medias de los venenos evaluados, con una Media de 6,56 mg/kg  $\pm$  0,14, donde fue más letal el veneno de *B. asper*. No se encontraron referencias sobre la  $DL_{50}$  de *B. rhombeatus* intraperitoneal (IP), sin embargo, al compararla con algunas especies del mismo género se encontró similitud con *B. asper* reportada en 100,9  $\mu$ g/ratón CD1 o 5,6 mg/kg (85), mientras que para *B. ayerbei* está reportado 50,1  $\mu$ g/ratón CD1, equivalente a 2,7 mg/kg (85). Investigadores como Alagón et al, 1980 y Mora-Obando, 2014 han reportado  $DL_{50}$  para *B. asper* IP en 4.3 mg/kg; 4.6 mg/kg; 5.6 mg/kg; 6.8 mg/kg, similar a los encontrado para *B. rhombeatus* (86).

#### 4.6 Dosis Efectiva Media ( $DE_{50}$ )

Se desarrolló la  $DE_{50}$  según lo descrito en metodología, retado con  $3DL_{50}$  del veneno de *B. rhombeatus*, encontrando una  $DE_{50}$  vía IP para el INS en 119,7  $\mu$ L AV con un intervalo de confianza de 116.3 -123.2 ( $R^2$ : 0,98) y para AVP-T de 270,2  $\mu$ L AV con un intervalo de confianza de IC: 258.2 - 282.7 ( $R^2$ : 0,93) (Figura 4-16 y Tabla 4-17).

Figura 4-16:  $DE_{50}$  Intraperitoneal de INS y AVP-T para la especie *B. rhombeatus*



Se realizaron los cálculos correspondientes a la cantidad de antiveneno necesario para neutralizar 1 mg de veneno teórico y se consignaron los resultados en la Tabla 4-17.

Tabla 4-17. Dosis efectiva de INS y AVP-T para los diferentes venenos.

		$\mu\text{IAV}/3\text{DL}_{50}$	Intervalo	R2	mlAV/mgV	mg/10mL
<i>B. rhombeatus</i>	INS	119,7	116,3 - 123,2	0.98	0,30	33,3
	AVP-T	270,2	258,2 - 282,7	0.93	0,68	14,7
<i>B. asper</i>	INS	62,7	56,04 - 70,25	0.96	0,15	66,6
	AVP-T	143,8	122,9 - 168,4	0.91	0,36	27,7
<i>B. atrox</i>	INS	75,15	72,3 - 78,06	0.99	0,18	55,5
	AVP-T	190,2	164,1 - 220,4	0.90	0,47	21,2
La vía de inoculación para $\text{DE}_{50}$ fue intraperitoneal $\mu\text{IAV}/3\text{DL}_{50}$ : microlitros de antiveneno necesarios para neutralizar 3 dosis letales medias mlAV/mgV: mililitros de antiveneno necesarios para neutralizar 1mg de veneno mgV/vial: miligramos de veneno teóricos que pueden neutralizar 10mL (1 vial) vía IP						

De

acuerdo con lo reportado por cada una de las casas comerciales, los antivenenos tienen la capacidad de neutralizar veneno de *Bothrops*, 30 mg/vial y 70 mg/vial, AVP-T e INS respectivamente (18,21). Sin embargo, se encontró que para el veneno de *B. rhombeatus*, la capacidad neutralizante de una vial de 10 mL sería de 33 mg y 14 mg para INS y AVP-T respectivamente si fueran de aplicación IP. Es importante considerar que estos cálculos están basados en la  $\text{DL}_{50}$  por vía intraperitoneal y la aplicación de los antivenenos como tratamiento médico es por vía intravenosa basados en la  $\text{DL}_{50}$  por esta misma vía, por lo que se debe tener en cuenta esta consideración antes de pensar en una extrapolación al uso clínico.

Para la neutralización del veneno de *B. asper* y *B. atrox*, se encontró que el INS requirió menor cantidad de antiveneno comparado con AVP-T, teniendo en cuenta que ambos venenos eran de origen mexicano, se puede inferir que efectivamente se comparten muchas fracciones del veneno en esas especies y se realizó reactividad cruzada de las fracciones del veneno con mayor efecto letal. Se observó además que AVP-T requirió siempre la mayor cantidad de antiveneno para neutralizar los 3 venenos, pero obtuvo los

mejores títulos de reconocimiento inmunoquímico de las fracciones, con mayor especificidad.

En múltiples estudios donde se evalúa la capacidad neutralizante de los antivenenos a nivel preclínico, se ha encontrado que los antivenenos polivalentes son capaces de reconocer algunas fracciones de los venenos de serpientes de otras regiones incluso veneno de otras especies diferentes a las utilizadas en su producción y además, pueden tener adecuada capacidad neutralizante, aunque requieran más antiveneno para ello (64,79,84,87–89). Lo que permite inferir que existen algunas fracciones de proteínas que son similares entre los venenos, las cuales no necesariamente son las más abundantes, inmunogénicas o las que causen el mayor efecto clínico, por tal motivo, se requiere en la medida de las posibilidades aumentar la calidad de los antivenenos haciéndolos más específicos y afines a las fracciones de interés, lo que significaría utilizar menor cantidad de antiveneno para reconocer los epítomos y neutralizarlos rápidamente.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- Al analizar el veneno de *Bothrops rhombeatus* a través de los métodos de electroforesis y HPLC, se encontró que está constituido principalmente por svMP I, II y III, LAAO, SP, CRISP y PLA<sub>2</sub>, similar al perfil proteico de los venenos de *B. asper* y *B. atrox*. Teniendo en cuenta este perfil del veneno, se puede inferir que la ofidiotoxicosis por mordedura de esta especie puede producir alteraciones tanto en la miotoxicidad, rabdomiolisis y necrosis, así como alteraciones en la coagulación con hemólisis diseminada y consumo de fibrinógeno.
- Con relación a la concentración proteica de los antivenenos, se encontró que fue mayor en el antiveneno del INS que AVP-T, acorde con las fracciones que lo componen, sin embargo, en el perfil electroforético se identificó en INS una posible fracción de albúmina y de alfa macroglobulina en AVP-T, lo cual, siendo medicamentos biológicos de proteínas heterólogas y de aplicación intravenosa, se consideran que pueden generar un alto riesgo para la presentación de Reacciones Adversas al Medicamento (RAM), como reacción anafiláctica o enfermedad del suero.
- Se encontró una mayor letalidad para el veneno de *B. asper*, seguida de *B. rhombeatus* y *B. atrox*, pero similares con una DL<sub>50</sub> IP promedio de 6,56 mg/kg +/- 0,14, por lo que se consideraron apropiados para ser utilizados en el experimento. Teniendo en cuenta esta dosis letal media y las fracciones encontradas en su veneno, se puede inferir que en caso de una mordedura por *B. rhombeatus* se podría presentar similitud en los procesos toxicocinéticos y toxicodinámicos, siendo difícil de diferenciar a nivel clínico si el veneno fue de *B. asper* o *B. rhombeatus*.
- Se requirió menor concentración del antiveneno INS que AVP-T para neutralizar el efecto letal de 3DL<sub>50</sub> del veneno de *B. rhombeatus*, por vía IP, lo cual se correlaciona con el porcentaje de acoplamiento por afinidad, concluyendo que algunas de las fracciones con acción fisiopatológica letal fueron reconocidas por reactividad cruzada

y neutralizadas. Hay que tener en cuenta que esta cantidad de antiveneno requerido para neutralizar  $3DL_{50}$  se desarrolló vía IP y hay diferencias en los resultados cuando se realiza vía IV, siendo menor la cantidad de antiveneno requerido por vía IV que por vía IP. Si se compara con los resultados obtenidos en esta investigación, no es congruente con la capacidad neutralizante que se describen los dos antivenenos (a pesar de la consideración de la vía de inoculación), dado que infieren neutralizar la misma cantidad de veneno para todo el género *Bothrops*.

- La neutralización del veneno de *B. asper* requirió menor concentración de antiveneno tanto de INS como AVP-T, comparado con *B. rhombeatus* y *B. atrox*, lo cual asociado a que fue el veneno más reconocido inmunoquímicamente y los antivenenos tuvieron más del 90% de afinidad a este veneno, se deduce que ambos antivenenos fueron elaborados con veneno de *B. asper*; Esta una de las especies de serpiente de mayor interés para la elaboración de los antivenenos a nivel de Latinoamérica, teniendo en cuenta que su capacidad de adaptación al medio le ha permitido abarcar una amplia distribución en casi todo el continente, es altamente reactiva y se considera una de las causantes principales de ofidismo, por lo tanto, su inclusión dentro de la mezcla para la inmunización de los equinos es casi obligatoria para los países latinoamericanos.
- Teniendo en cuenta que ninguno de los antivenenos analizados fue elaborado con veneno de *B. rhombeatus*, se asume que la neutralización y reconocimiento de las fracciones proteicas fue debida a la reactividad cruzada con las proteínas similares de los venenos con los que fueron inmunizados los equinos. Por lo tanto, una de las recomendaciones que surge de esta observación y análisis, es que se introduzca este veneno dentro de la mezcla para la inmunización de los equinos, debido a que la baja especificidad de los antivenenos al veneno de *B. rhombeatus*, se traduce en un aumento del número de viales a utilizar, buscando con la alta concentración de proteína la reactividad cruzada y la neutralización.
- La prueba ELISA mostró diferencias estadísticamente significativas de los antivenenos INS y AVP-T y entre los grupos de venenos, lo que significa que ninguno reconoce la misma cantidad ni los mismos epítopes estructurales en los tres venenos utilizados, haciendo clara la necesidad de que los antivenenos sean más específicos en su elaboración, publiquen los venenos con los cuales han sido elaborados y las especies de serpiente que pueden reconocer estructuralmente de manera directa y por reactividad cruzada, no solo el género.

- Teniendo en cuenta que un reconocimiento no implica neutralización de las fracciones con mayor actividad en la fisiopatología de la ofidiotoxicosis, los resultados de la prueba ELISA junto con los de  $DE_{50}$ , evidenciaron que para neutralizar la dosis letal del veneno de *B. rhombeatus* se requirió mayor concentración de antiveneno tanto de INS como AVP-T. Este resultado tiene implicaciones clínicas, donde utilizar una gran cantidad o concentración de proteínas heterólogas para la neutralización, genera un gran riesgo para los pacientes.
- Los resultados de Western Blot permitieron identificar electroforéticamente las fracciones reconocidas por cada antiveneno, encontrándose menor visualización de bandas del veneno *B. rhombeatus* con AVP-T, comparado con el INS, sin embargo, confrontado con *B. asper* y *B. atrox*, se evidencia la baja especificidad de ambos antivenenos hacia *B. rhombeatus*. Además, con la notable asociación de AVP-T hacia los venenos de *B. asper* y *B. atrox*, se infiere que éstos dos venenos mexicanos se utilizaron para su elaboración.
- Se demostró que ambos antivenenos tuvieron alta afinidad (más del 90%) al veneno completo de *B. rhombeatus* a pesar de su baja especificidad, lo cual es explicado por la alta concentración de antiveneno que fue requerido para el reconocimiento de epítopes estructurales y su efecto en la reactividad cruzada para la neutralización.
- La combinación de los métodos de caracterización preliminar de veneno, separación de proteínas y de afinidad inmunoquímica permitieron establecer cualitativa y cuantitativamente la especificidad de los antivenenos al veneno completo y a las fracciones específicas reconocidas.
- Para evaluar la eficacia de los antivenenos a nivel general se utiliza la capacidad neutralizante o  $DE_{50}$ , pero lo demostrado en este estudio, es que la mayor importancia radica en que los antivenenos sean específicos y afines a las fracciones de interés clínico, teniendo en cuenta la inmunogenicidad, su abundancia en un veneno particular y el efecto tóxico de las fracciones. Dado lo anterior, en esta investigación se concluyó que los antivenenos evaluados tienen una capacidad neutralizante similar, pero se diferencian en el reconocimiento de las fracciones debido a que no son específicos para el veneno de *B. rhombeatus* y por lo tanto requieren alta concentración de antiveneno para lograr el reconocimiento y la neutralización por reactividad cruzada.

## 5.2 Recomendaciones

- Este es el primer estudio de aproximación para la caracterización del veneno de *Bothrops rhombeatus* por lo tanto se recomienda y se hace necesario continuar con estudios de proteómica y antivenómica en las futuras investigaciones.
- Este trabajo se comparó con las investigaciones realizadas para el veneno de *B. asper* dado que no existen artículos previos con el veneno de *B. rhombeatus*, por lo tanto, se buscó la especie más similar para generar un punto de comparación.
- Se recomienda incluir el veneno de esta especie en la generación de la mezcla para la inmunización de los equinos en la producción de los antivenenos comercializados en Colombia, teniendo en cuenta que no se reconocieron proteínas de pesos similares a la svMP III y SP en las pruebas inmunoquímicas.
- Los antivenenos deberían especificar en el inserto las especies de serpiente con las que fueron inmunizados los animales de producción y la cantidad de veneno que puede neutralizar de cada especie por reconocimiento directo y por reactividad cruzada, dado que en el inserto se limitan a indicar una cantidad de veneno que puede neutralizar para todo un género de serpientes, creando confusión en el equipo médico al influenciar que se piense que ese vial de antiveneno neutraliza igualmente para todas las especies de un mismo género.
- Se recomienda para los antivenenos comercializados en Colombia tener mejores métodos de purificación de albúmina y agregados de proteína para disminuir el riesgo de RAM en los pacientes tratados.

### **5.3 Limitaciones**

- Se encontró limitación al desconocer los venenos de las serpientes con que fueron elaborados los antivenenos, dado que en los insertos no son claros con esta información.
- Debido a la poca disponibilidad de los venenos en Colombia, se consideró una limitante no poder desarrollar el estudio tomando como control veneno de otra especie propia del país.
- Una de las mayores limitantes para el estudio de toxinas animales son los procesos burocráticos nacionales que obstaculizan el proceso de investigación, demoran los permisos e impiden comercialización de los venenos animales y de los serpentarios con fines de investigación.



## A. Anexo: Aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité de Bioética  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia  
Sede Bogotá



Bogotá D.C., mayo 15 de 2019

[CB-FMVZ-UN-019-19]

Doctora  
**KAREN SOLANYI SARMIENTO ACUÑA**  
Investigador Principal - Tutor  
Universidad Nacional de Colombia

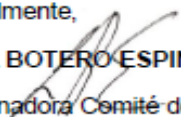
Apreciada Doctora:

Amablemente le comunico que el Comité de Bioética en sesión del 7 de mayo de 2019, (Acta 03), luego de la revisión de las observaciones realizadas y de la documentación recibida del siguiente proyecto acordó emitir el respectivo concepto, así:

<i>Proyecto</i>	“COMPARACION DE LA ESPECIFICIDAD Y CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE DOS ANTIVENENOS ANTIOFÍDICOS RETADOS CON VENENO DE Bothrops asper, DE COLOMBIA ”
<i>Responsables del proyecto</i>	Investigador Principal: Karen Solanyi Sarmiento Acuña Estudiante: Karen Solanyi Sarmiento Acuña
<i>Concepto</i>	Se renueva el aval

Es importante tener en cuenta que este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados. Es importante tener en cuenta que este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Cordialmente,

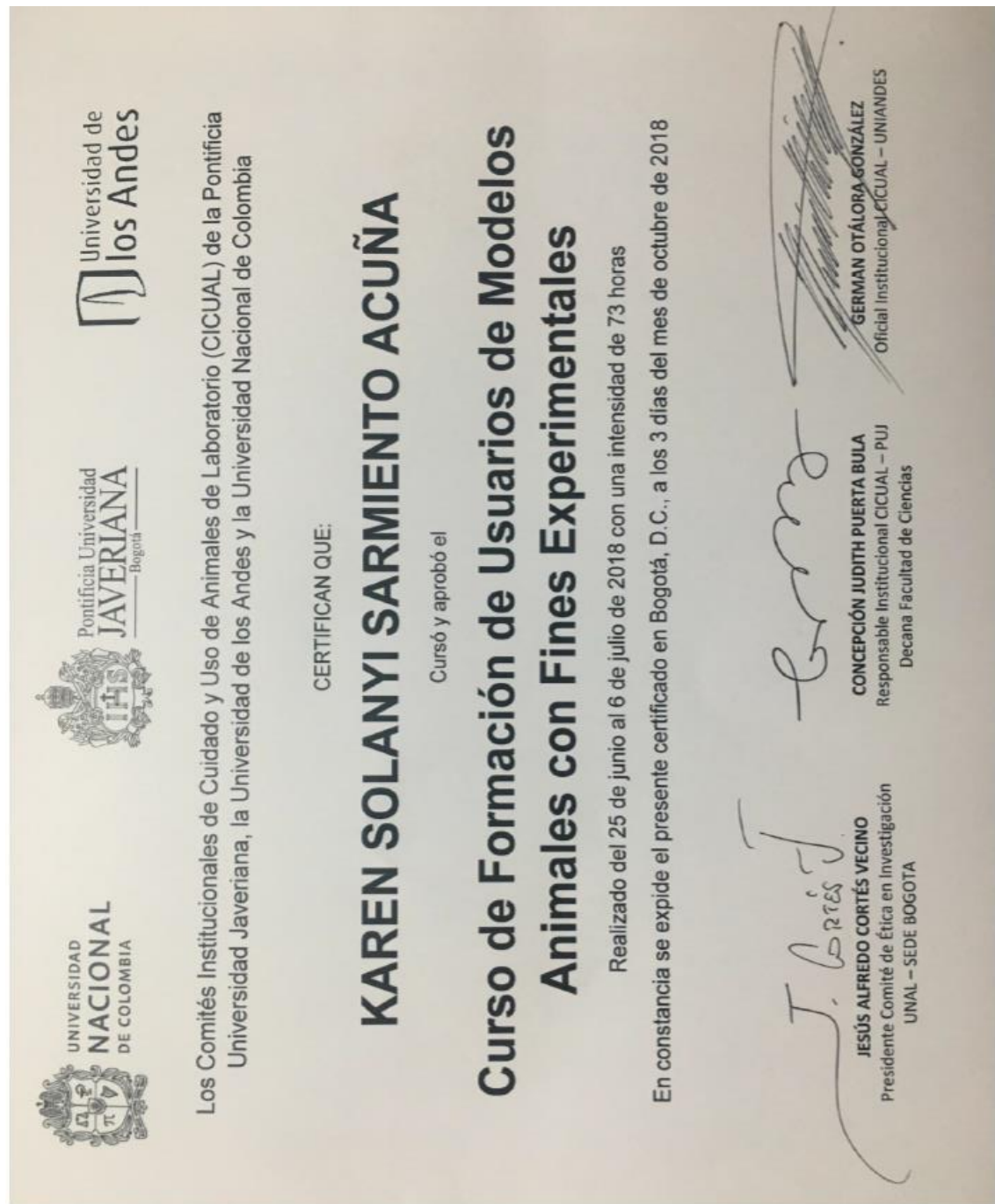
  
**LUCÍA BOTERO ESPINOSA**

Coordinadora Comité de Bioética





**B. Anexo:** Certificación del curso de Formación de Usuarios de Modelos de Animales con fines Experimentales





## **C. Anexo:** Método de Cuantificación de proteína por Absorbancia 280nm (IBT)

1. Realizar la dilución de la muestra en PBS
2. Medir la absorbancia del blanco (solución en la cual fue diluida la muestra)
3. Medir la absorbancia de la muestra
4. Multiplicar el valor de la Abs por la dilución.

## **D. Anexo: Método de Cuantificación de proteína por BCA (IBT)**

### **1. Materiales:**

- a. Reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.01M de hidróxido de sodio.
- b. Reactivo B: 4% de sulfato cúprico
- c. Albúmina sérica bovina (BSA): solución stock a 2mg/mL en 0.9% NaCl y 0.05% de azida de sodio.
- d. Lector de ELISA con filtro 570nm
- e. Microplacas para ELISA de 96 pozos marca Falcon

### **2. Preparación de estándares (ST)**

- a. Rotular 5 tubos marca Eperdorf de 2mL con la siguiente enumeración (la cual equivale a la concentración en  $\mu\text{g/mL}$  de BSA).
  - i. 320  $\mu\text{g/mL}$
  - ii. 160  $\mu\text{g/mL}$
  - iii. 80  $\mu\text{g/mL}$
  - iv. 40  $\mu\text{g/mL}$
  - v. 20  $\mu\text{g/mL}$
- b. Colocar 1mL de PBS 1x pH 7.2 del tubo 2 al 5
- c. A partir de una solución stock de BSA con una concentración de 2mg/mL, en el tubo 1 colocar:
  - i. 320  $\mu\text{l}$  de stock de BSA
  - ii. 1680  $\mu\text{l}$  de PBS 1x
- d. Realizar diluciones seriadas 1:2 partiendo del tubo 1 al tubo 5, transfiriendo 1mL a cada tubo, mezclar pipeteando 5-7 veces en cada ocasión.

- 
3. Preparación de la muestra problema (MP).
    - a. Decidir la dilución en que debe prepararse la solución problema para que se encuentre dentro del rango de la curva estándar (20–320  $\mu\text{g/mL}$ ), en un volumen suficiente para hacer duplicados. Considerando 25 $\mu\text{l}$  por pozo.
  4. Preparación de la mezcla de reacción (MR)
    - a. Determinar el volumen total de la MR, se debe tomar en cuenta el número de muestras y si estas serán por duplicado, el número de estándares, el número de blancos, la suma de todos (muestra + estándares + blancos), se debe multiplicar por 200  $\mu\text{l}$ , el resultado será el volumen total de la mezcla de reacción requerido.
    - b. Preparar MR mezclando 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B.
  5. Procedimiento para microplacas marca Falcon.
    - a. Transferir 25 $\mu\text{l}$  de cada ST y de MP de diferentes pozos, incluir dos blancos los cuales solo llevan el amortiguador en que se encuentran diluidas las muestras y los estándares.
    - b. Añadir 200 $\mu\text{l}$  de MR a cada pozo y mezclar en el lector de ELISA por 30 seg.
    - c. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37°C por dos horas
    - d. Leer la absorbancia en el lector de ELISA con un filtro de 570nm utilizando el método de BCA que se encuentra en el programa Magellan.

## **E. Anexo: Método de Cuantificación de proteína por Método de Bradford (IBT)**

1. Preparar una dilución de Protein Assay Bio-Rad, 1:5 en H<sub>2</sub>O destilada
2. Se prepara una curva estándar (IgG o BSA) realizando 5 diluciones seriadas (1:2) iniciando con una concentración inicial de 500 – 31.25 µg/mL en solución salina (NaCl 150nm).
3. Para realizar la curva estándar se toman 10µl de cada una de las concentraciones antes preparadas (por duplicado).
4. De las muestras a cuantificar se colocan 10µl / pozo por triplicado (hacer una dilución si es necesario en solución salina).
5. Como banco se utiliza 10µl de solución salina (por duplicado).
6. A todos los pozos se les adiciona 200 µl de la solución de protein Assay Bio-Rad (Coomassie en dilución 1:5), se deja reaccionar por lo menos 5min a temperatura ambiente y se realiza la lectura a 595nm en el lector de ELISA (Sunrise-Tecan).

---

## **F. Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (IBT)**

### **Soluciones**

1. Solución de acrilamida: (30% de acrilamida + 0.8% bis-acrilamida). Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165mL de agua desionizada.
2. Amortiguador inferior: (1.5M de tris + 0.4% de SDS). Disolver 18.7 g de tris en 50mL de agua desionizada y adicionar 2mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCL concentrado y aforar a 100mL.
3. Amortiguador superior: (0.5M de tris + 0.4% SDS). Disolver 6.06g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100mL.
4. Amortiguador de corrida: (0.25M tris + 0.19M glicina + 0.1% SDS). Para una solución 10x, disolver 15.2g de tris y 72.1 g de glicina con 300mL de agua desionizada y adicionar 25mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 8.6 con 10M NaOH. Aforar a 500mL.
5. Amortiguador de corrida desnaturizante 5x: (10% glicerol + 2.5% SDS + 50mM tris HCl pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol).
6. En un tubo marca Falcon de 15mL mezclar los siguientes volúmenes: 2,5mL de glicerol, 3.125mL de SDS al 20%, 1.25 mL de 1M tris-HCl pH 6,8, 1.25 mL de 2 mecarptoetanol, 0.5mL de 1% de bromofenol y aforar a 10mL con agua desionizada.
7. Persulfato de amonio al 10%: Disolver 0.1g de persulfato de amonio en 1mL de agua desionizada.

8. Solución de tinción: (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomassie R-250). Disolver 1g de azul de Coomassie R-250 en 125 mL de isopropanol, 50mL de ácido acético y aforar a 500mL con agua desionizada.
9. Solución para desteñir: (10%  $\beta$ -mercaptoetanol + 10% ácido acético). Mezclar 400mL de agua desionizada, 50mL de metanol y 50mL de ácido acético.
10. Los geles fueron formulados de la siguiente manera:
  - a. Gel separador al 15%
    - i. Lower buffer: 1.5mL
    - ii. Sln acrilamida: 3mL
    - iii. H<sub>2</sub>O desionizada: 1.5mL
    - iv. TEMED 5 $\mu$ l
    - v. PSA 10% 20 $\mu$ l
  - b. Posteriormente al gel separador se adiciona la solución del Gel concentrador 4%
    - i. Upper buffer: 0.63mL
    - ii. H<sub>2</sub>O desionizada: 1.54mL
    - iii. Sln acrilamida: 0.33mL
    - iv. TEMED: 2.5 $\mu$ l
    - v. PSA 10%: 12.5 $\mu$ l
11. Se deja polimerizar entre 20-30 minutos.
12. Se prepara la muestra con Sample Buffer a una concentración final de aproximadamente 500 $\mu$ g de proteína/mL. Utilizar 10-20 $\mu$ l de cada muestra para cada columna del gel.
13. Añadir a la muestra del veneno + 3mL de  $\beta$ -mercaptoetanol 5x + PBS hasta completar 15 $\mu$ l (volumen final de cada carril).
14. Se disponen en baño de maría y se deja hervir por 5 minutos
15. Se centrifugan 30 segundos a 4000 rpm
16. Se cargan los marcadores de peso molecular MPM
17. Se cargan los 15 $\mu$ l de muestra en cada carril
18. Se establece un flujo continuo de 70mV en la fuente de poder durante 20 minutos
19. Se modifica el flujo continuo a 120 en la fuente de poder por 60 minutos



- 
20. Posterior al tiempo de corrida se retiran los geles de los vidrios
  21. Se tiñen con solución de tñido durante 20 minutos en agitación, calentando la mezcla con el gel durante 20 segundos.
  22. Se pasa por solución de desteñido durante 40 minutos en agitación calentando la mezcla con el gel durante 20 segundos. Este procedimiento se repite hasta que se vea diferencia entre las bandas teñidas y el gel.

## **G. Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (IBUN)**

1. Preparación de stocks
  - a. Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (w/v)
  - b. Solución TRIS-HCL 2M (pH 8.8)
  - c. Solución TRIS-HCL 1M (pH 6.8)
  - d. Glicerol al 50% (v/v)
  - e. Azul de bromofenol 1% (w/v)
2. A partir de las soluciones stock se preparan las siguientes soluciones de trabajo:
  - a. Solución A: acrilamida – bisacrilamida 30% (w/v)
  - b. Solución B: buffer gel de separación 4x.
  - c. Solución C: buffer gel de concentración 4x.
  - d. Buffer de electroforesis pH 8.3
  - e. Buffer para preparar las muestras
  - f. Persulfato de amonio 10%
  - g. Solución de tinte azul brillante de Coomassie: metanol, ácido acético glacial, agua, colorante Coomassie blue R250.
  - h. Solución para destintado
3. Preparación del gel de separación al 12.5% en la cámara electroforética se adicionan:
  - a. 4.2mL de solución A
  - b. 2.5mL de solución B
  - c. 3.3mL de agua tipo 1 o HPLC
  - d. 50µl de persulfato de amonio al 10%
  - e. 5µL de TEMED.
  - f. Polimerizar la reacción durante 60 minutos.
4. Preparación del gel de concentración al 5%.
  - a. 2.3mL de agua tipo 1 o HPLC
  - b. 0.67mL de solución A
  - c. 1mL de solución C
  - d. 30µl de persulfato de amonio al 10%

- 
- e. 10 $\mu$ l de TEMED
  - f. Polimerizar durante 30 minutos
5. Se prepara la muestra con Sample Buffer de carga
  6. Se prepara la muestra con Sample Buffer a una concentración final de aproximadamente 500 $\mu$ g de proteína/mL. Utilizar 10-20 $\mu$ l de cada muestra para cada columna del gel.
  7. Añadir a la muestra del veneno + 3mL de  $\beta$ -mercaptoetanol 5x + PBS hasta completar 16 $\mu$ l (volumen final de cada carril).
  8. Se cargan los marcadores de peso molecular MPM
  9. Se carga la muestra en cada carril
  10. Se establece un flujo continuo de 100mv en la fuente de poder durante 1 hora aproximadamente
  11. Posterior al tiempo de corrida se retiran los geles de los vidrios
  12. Se tiñen con solución de tñido durante 40 minutos en agitación.
  13. Se pasa por solución de desteñido durante 20 minutos en agitación

## H. Anexo: Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (IBT)

### Preparación de la muestra:

- a. Se resuspende el veneno en PBS dependiendo de su concentración (No se deben cargar más de 3mg de veneno).
- b. Se le añade 1.2mL de agua con TFA 0.1% a la muestra de veneno
- c. Se centrifuga la muestra 3 minutos a 14000 rpm
- d. Se toma el sobrenadante y se traspasa a otro tubo (sin coger el pelet)

### Preparación de la fase móvil

- e. Solución A: agua destilada + 0.1% TFA. (0.5mL de TFA en 499.500mL de H<sub>2</sub>O destilada, para hacer 500mL)
- f. Solución B: acetonitrilo + 0.1% TFA (500mL de acetonitrilo + 500µl de TFA)

### Preparación del programa y del equipo

- g. Se prepara una columna C-18 (250 x 4.6mm) y se ubica de acuerdo con las indicaciones de la misma. (La columna debió permanecer conservada en acetonitrilo (B) 100% del último lavado).
- h. Se aplica un protocolo de lavado para la columna que debe incluir:
  - i. 5 min 0% B
  - ii. 5 min 100% B
  - iii. 5 min 0% B
  - iv. 5 min 100% B
- i. Se selecciona a un flujo de 1mL/min

### Correr la muestra

- j. Se verifica que la bomba de la solución B esté en 0%
- k. Se selecciona un flujo de 1mL/min.
- l. Se escoge un método o se programa para que corra la muestra con un gradiente lineal de solución B de 5% durante los primeros 5 minutos, 5-15% de B en 10 minutos; 15-45% de B en 60 minutos y de 45-70% en 15 minutos, para un total de 90 minutos de corrida.
- m. Se lava con agua

- 
- n. Se carga la jeringa con la muestra y se inyecta toda en un solo tiempo
  - o. Se activa manualmente la palanca dese load hasta inject.
  - p. Al final de los 90 minutos de corrida se verifica que la bomba B esté en 0% y A en 100%.

## I. Anexo: Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (IBUN)

1. Preparación de la muestra:
  - a. Se resuspende el veneno en PBS dependiendo de su concentración (No se deben cargar más de 3mg de veneno).
  - b. Se le añaden 100 $\mu$ l de TFA 0,1% + 100mL de acetonitrilo a la muestra
  - c. Se centrifuga la muestra 3 minutos a 14000 rpm
  - d. Se toma el sobrenadante y se traspasa a otro tubo (sin coger el pelet)
2. Preparación de la fase móvil
  - a. Solución A: agua destilada + 0,1% TFA. (0.5mL de TFA en 499.500mL de H<sub>2</sub>O destilada, para hacer 500mL)
  - b. Solución B: acetonitrilo + 0.1% TFA (500mL de acetonitrilo + 500  $\mu$ l de TFA)
3. Preparación del programa y del equipo
  - a. Se prepara la columna C-18 (250 x 4.6mm) y se ubica de acuerdo con las indicaciones de la misma. (La columna debió permanecer conservada en acetonitrilo (B) 100% del último lavado).
  - b. Se selecciona a un flujo de 1mL/min y se estabiliza la columna en el HPLC
  - c. Se selecciona tomar muestra de 20 $\mu$ l
  - d. Se selecciona Setin en 215nm
4. Correr la muestra
  - a. Se selecciona un flujo de 1mL/min.
  - b. Se selecciona un gradiente lineal de solución B de 5% durante los primeros 10 minutos, 5-15% de B en 10-30 minutos; 15-45% de B en 30-150 minutos y de 45-70% en 150-170 minutos, para un total de 180 minutos de corrida.
  - c. Se cargan las muestras en los microviales dispuestos para el HPLC
  - d. Se da nombre al archivo resultante y se presiona start.
  - e. Al final de los 180 minutos de corrida se verifica que la bomba B esté en 0% y A en 100%.

---

## J. Anexo: Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)

1. Previamente se debe conocer la cuantificación de proteína del vial de veneno
2. El día de la experimentación se pesa una cantidad adecuada de veneno de acuerdo con la cuantificación anterior.
3. El veneno se resuspende en solución salina normal 0.9%
4. Se verifica la concentración de proteína por absorbancia 280
5. Se diseña el experimento teniendo en cuenta la concentración, el volumen de veneno, de solución salina, los niveles de veneno a probar y la cantidad de animales totales.
6. Se preparan las mezclas del veneno con solución salina 0.9% en todos los casos
7. La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos
8. Se verifica el peso de los animales a utilizar
9. Se cargan las agujas de 1mL o jeringa para insulina con aguja calibre 27G.
  - a. Para la aplicación intravenosa el volumen máximo es de 0.2mL.
  - b. Para la aplicación intraperitoneal el volumen máximo es de 0.5mL
10. Se inician procedimientos para vasodilatar la cola utilizando convección de calor con una lámpara o por conducción con agua tibia, teniendo precaución de no quemar el animal.
11. Se inoculan los animales empezando por la dosis más baja y se ubican en la misma caja, se observan por 5 minutos (mirar la velocidad de inicio de los síntomas o si hay mortalidad)
  - a. Siempre se marca la caja con la dosis de veneno, el tipo de veneno y el nombre del investigador responsable.
  - b. Los animales que tengan el mismo nivel de veneno deben estar en la misma caja.
12. Se observa el comportamiento de los animales inmediatamente la inoculación
13. Se anota la mortalidad a las 24 horas posterior a la inoculación
14. Todos los animales deben ser desechados de acuerdo con los protocolos de eutanasia de cada laboratorio.
15. Una vez obtenida la mortalidad desde 0–100% se analizan con el programa estadístico disponible.

## K. Anexo: Dosis Efectiva Media (DE<sub>50</sub>)

1. Previamente se debe conocer la cuantificación de proteína del vial de veneno
2. El día de la experimentación se pesa una cantidad adecuada de veneno de acuerdo con la cuantificación anterior.
3. El veneno se resuspende en solución salina normal 0.9%
4. Se verifica la concentración de proteína por absorbancia 280 del veneno y del antiveneno.
5. Se diseña el experimento teniendo en cuenta la concentración, el volumen de 3DL<sub>50</sub> de veneno, de solución salina, los niveles de antiveneno a probar y la cantidad de animales totales.
6. Se preparan las mezclas del veneno con solución salina 0.9% en todos los casos
7. La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos
8. Se verifica el peso de los animales a utilizar
9. Se cargan las agujas de 1mL o jeringa para insulina con aguja calibre 27G.
  - a. Para la aplicación intraperitoneal el volumen máximo es de 0.5mL
10. Se inoculan los animales empezando por la dosis más baja y se ubican en la misma caja, se observan por 5 minutos (mirar la velocidad de inicio de los síntomas o si hay mortalidad)
  - a. Siempre se marca la caja con la dosis de antiveneno, el tipo de veneno y el nombre del investigador responsable.
  - b. Los animales que tengan el mismo nivel de antiveneno deben estar en la misma caja.
11. Se observa el comportamiento de los animales inmediatamente la inoculación
12. Se anota la sobrevivencia a las 24 horas posterior a la inoculación
13. Todos los animales deben ser desechados de acuerdo con los protocolos de eutanasia de cada laboratorio.
14. Una vez obtenida la sobrevivencia desde 0–100% se analizan con el programa estadístico disponible.



---

## L. Anexo: Inmunoensayo Indirecto ELISA (IBT)

1. Soluciones:
  - a. Solución de sensibilización: (100mM NaHCO<sub>3</sub>). Disolver 4.2g de NaHCO<sub>3</sub> en 450mL de agua destilada. Ajustar el pH a 9.5 con NaOH 10N. Aforar a 500mL.
  - b. Solución de lavado: (150mM NaCl + 50 mM Tris-HCl + 0.05% Tween 20). Disolver 1.46g de NaCl en 700mL de agua destilada. Agregar 50mL de Tris-HCl pH8 1M y aforar a 1L con agua destilada. Agregar 500 µl de Tween 20.
  - c. Solución de bloqueo: (0,5% gelatina + 50mM Tris-HCl + 0.05% Tween). Disolver 2.5g de gelatina en 350mL de agua destilada. Agregar 25mL de Tris-HCl pH 8 1M y aforar a 500mL. Agregar 250µl de Tween 20.
  - d. Solución de reacción: (500mM NaCl + tris-HCl + 0.1% gelatina + 0.05% Tween 20) Disolver 0.5g de gelatina y 14.61 g de NaCl en 350mL de agua destilada. Agregar 25mL de Tris-HCl pH8 1M. Aforar a 500mL y agregar 250µl de Tween.
2. Sensibilizar las placas de ELISA (marca Nuck de 96 pozos) con 1µg/mL de veneno reconstituido en buffer 100mM carbonato/bicarbonato pH 9.5, adicionar a cada pozo 100µl de veneno de la columna 1 hasta la 11 y posteriormente incubar durante 2h a 37°C (o bien toda la noche a 4°C).
3. Lavar los pozos 3 veces con 200 µl/pozo de solución de lavado para ELISA.
4. Bloquear los sitios inespecíficos (lugares en donde no se pegó el veneno, para evitar uniones inespecíficas) con 200µl de solución de bloqueo para ELISA durante 2h a 37°C (o bien toda la noche a 4°C).
5. Lavar los pozos 3 veces con 200 µl/pozo de solución de lavado para ELISA.
6. Incubar con el primer anticuerpo, agregar 100 µl de solución de reacción de la columna 2 a la 12, enseguida colocar 150 µl de la primera dilución 1:3 (que contiene 50 µg del antiveneno) en la primera columna. A partir de ésta tomar 50 µl y depositarlos en la columna 3 y así sucesivamente hasta la columna 10. La columna

11 se toma como control negativo y la columna 12 es el blanco, dejar incubar durante 1h a 37°C.

7. Lavar los pozos 3 veces con 200µl/pozo de solución de lavado para ELISA.
8. Incubar con el segundo anticuerpo (conjugado). Hacer una dilución 1:1000 del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina en amortiguador de reacción (el segundo anticuerpo puede ser anti-caballo o anti-oveja para los antivenenos a probar) agregar 100 µl/pozo e incubar por 1h a 37°C.
9. Lavar los pozos 3 veces con 200µl/pozo de solución de lavado para ELISA
10. Revelado ABTS:
  - a. Adicionar el sustrato para fosfatasa alcalina PNPP (marca Zymed) 1mL de amortiguador para PNPP + 100µl de PNPP y aforar a 10mL con agua destilada y adicionar 100µl a cada uno de los pozos.
  - b. Leer en un lector de ELISA a 405nm a los 5,15,20 y 30 min.
  - c. Se añade una solución de SDS20% para detener la reacción.

---

## M. Anexo: Western Blot (IBT)

### 1. Soluciones

- a. Solución amortiguadora TBST
  - i. 1mM Tris-HCl pH 7.5, 5mL
  - ii. 5M NaCl, 15mL
  - iii. 0.2% Tween-20, 250  $\mu$ l
- b. Amortiguador de transferencia Nitrocelulosa (para 500mL).
  - i. 39mM de Glicina, 1.45g
  - ii. 48mM Tris-base, 2.9g
  - iii. SDS al 0.037%, 0.185g
  - iv. metanol al 20%, 100mL
- c. Buffer de transferencia CAPS (inmobilom-P para 1.2L)

### 2. Procedimiento

- a. Realizar geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).
- b. Cargar 5 $\mu$ g de veneno en cada uno de los carriles y correr las muestras
- c. Remojar 6 trozos de papel filtro y uno de nitrocelulosa cortada al mismo tamaño del gel y se remoja en amortiguador de transferencia por 15 minutos.
- d. Cuando haya terminado de correr el gel, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (0.45 $\mu$ m) marca BIO-RAD (la membrana previamente humedecida en amortiguador de transferencia). La transferencia se realiza en una cámara del tipo semi-húmeda a corriente constante de 400 mV, durante 1h.
- e. Bloquear los sitios en donde no se encuentra absorbido el veneno (antígeno) para evitar uniones inespecíficas. El bloqueo se realiza con 5% de leche descremada marca "Svelty" en amortiguador TBST 1x en agitación constante durante 2h o toda la noche.
- f. Lavar la membrana 3 veces, 10 minutos cada lavado con TBST 1x.

- g. Incubar con el primer anticuerpo por 1h (antiveneno retado) dependiendo del experimento con diluciones 1:500 o 1:100 del antiveneno en 10mL totales. Dejar en agitación constante a temperatura ambiente durante 1h.
- h. Lavar la membrana 3 veces, 10 minutos cada una, con TBST 1x.
- i. Incubar con el segundo anticuerpo IgG de conejo anticaballo acoplado a fosfatasa alcalina marca Rockland, ó IgG de conejo antioveja acoplado a fosfatasa alcalina marca Zymed o IgG de cabra anticaballo acoplado a fosfatasa marca KPL, en una dilución 1:1000 en TBST 1X.
- j. Finalmente revelar utilizando el sustrato para fosfatasa alcalina (NBT 300µl + BCIP 300µl + agua 2400µl). Lavar y secar la membrana para ser escaneada.

---

## N. Anexo: Cromatografía de Afinidad (IBT)

### 1. Reactivos y Soluciones

- a. Sefarosa 4B activada con Bromuro de cianógeno (4B CNBr)
- b. Solución de lavado: Tris-HCl pH 8 1M+ NaCl 0,3M
- c. Solución de elución 1:100mM de ácido acético
- d. Solución de elución 2: NaOH
- e. Amortiguador: Tris 1M pH 8

### 2. Procedimiento de acoplamiento

- a. Pesar 5.5 mg de veneno y resuspender en 1mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M + NaCl 150mM. Cuantificar por Abs 280nm.
- b. Pesar 5g de resina 4B CNBr y agregar 20mL de Tris HCl 1M, dejar reposar con agitación (NUTATOR) durante 15minutos a temperatura ambiente, con el fin de hinchar la resina wester
- c. Dejar reposar la resina 10min aproximadamente. Para sedimentar y retirar el líquido, eliminando impurezas, agregar 20mL de Tris HCl 1M.
- d. Filtrar en un embudo (Buchner) con papel filtro whatman mediante vacío leve y agregar 15mL de Tris HCl para lavar la resina (repetir 5 veces los lavados).
- e. Con una espátula recuperar la resina y agregar 1mL de la muestra a acoplar más 4mL de solución de lavado.
- f. Agitar suavemente durante 1h o toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente tomar una muestra de 1mL de la resina y darle un pulso en la centrífuga, tomar el sobrenadante y determinar la Abs 280nm para determinar el porcentaje de acoplamiento y regresar la resina al tubo original.

### 3. Purificación

- a. La resina es colocada a una columna de 10mL, dejar sedimentar y recircular el líquido, posteriormente se pasan 10mL de buffer de lavado para equilibrar la columna.

- b. A continuación, se adiciona la proteína a purificar, pasándola a través de la resina con flujo lento.
- c. Colocar buffer de lavado colectando 1mL en tubos separados. Detener el lavado cuando se obtenga una Abs 280nm de 0.05 o menos.
- d. Colocar 0.5mL de tris HCl 1M pH8 para neutralizar las soluciones que se colectaron.
- e. Eluir con un volumen necesario de solución de elución 1. Colectar 1mL en tubos que contengan 0,5mL de 1M Tris-HCl pH8 para prevenir desnaturalización de la proteína.
- f. Pasar solución de lavado hasta obtener Abs 280nm cercanas a 0.05 o menos.
- g. Eluir con un volumen de solución con elución 2. Colectar 1mL en tubos que contengan 0.5mL de 1M Tris-HCl pH8 para prevenir desnaturalización de la proteína.
- h. Pasar solución de lavado hasta obtener Abs 280nm cercanas a 0.05 o menos y recoger en tubos que contengan 0,5mL de 1M Tris-HCl pH8 para prevenir desnaturalización de la proteína.
- i. La columna se lava con 20mL de amortiguador de lavado y se deja en 10mL de PBS 1X pH 7.2 y 0.02% de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).
- j. Guardar la columna a 4°C.

---

## Bibliografía

1. Minambiente. Programa nacional para la conservación de serpientes en Colombia [Internet]. Corantioqu. Colombia. U nacional de, editor. Bogota; 2013. 1-77 p. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/259648313>
2. Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 Años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. 2002;50(2):377–94.
3. Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez JMG. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Revista de Biología Tropical*. 2002;50(1):14.
4. Pereañez JA, Camilo-Patiño A, Henao-Castañeda IC. Toxinas provenientes de venenos de serpiente: blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*. 2014;1(1):49–60.
5. Murillo, J. Prada E. Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia viperidae *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonia. Universidad de la Amazonía; 2009.
6. Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*. 2002;40(8):1107–14.
7. Karaye KM, Mijinyawa MS, Yakasai AM, Kwaghe V, Joseph GA, Iliyasu G, et al. Cardiac and hemodynamic features following snakebite in Nigeria. Vol. 156, *International journal of cardiology*. 2012. p. 326–8.
8. Silveira de Oliveira J, Rossan de Brandão Prieto da Silva A, Soares MB, Stephano M a, de Oliveira Dias W, Raw I, et al. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;267:887–91.
9. Guerrero, J. Benard-Valle, M. Restano, R. Corzo F, Alagón, A. Olvera A. Cloning and sequencing of three- finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie*. 2018;147:114–21.

10. Rey-Suarez P, Nunez V, Saldarriaga-Cordoba M, Lomonte B. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie*. 2017 Jun;137:88–98.
11. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Accidente Ofídico [Internet]. Instituto Nacional de Salud INS. 2014. Available from: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-vigilancia/sivigila/Protocolos SIVIGILA/PRO Accidente Ofídico.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Accidente%20Ofidico.pdf)
12. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Accidente ofídico 2019. 2019.
13. Herrera C, Macêdo JKA, Feoli A, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM, et al. Muscle Tissue Damage Induced by the Venom of *Bothrops asper*: Identification of Early and Late Pathological Events through Proteomic Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(4):1–22.
14. Laines J, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Vargas M, Alvarez G, et al. Toxicity of *Bothrops sp* snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon*. 2014;88:34–7.
15. Mora-Obando D, Guerrero-Vargas JA, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics* [Internet]. 2014;96:159–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
16. Folleco AJF. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (Serpientes Viperidae) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García, 1896) y descripción de una nueva especie. *Revista Novedades Colombianas*. 2010;0(GARCÍA):33–70.
17. Avila, A. Cortés, J. Moreno A. Toxicología en urgencias. primera. CELSUS, editor. Bogotá, Colombia; 2015. 595 p.
18. Instituto Nacional de Salud. Inserto Suero Antiofídico Polivalente VI:06 [Internet]. Vol. 06. 2017. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
19. Ministerio de salud y protección social. Decreto 386 de 2018. 2018.
20. Instituto Nacional de Salud. Circular 3-0870. 2010.
21. Bioclon. Faboterápico polivalente antiofídico Antivipmyn [Internet]. Mexico; 2017. p.



- 
4. Available from:  
[http://consultaregistro.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg\\_encabcum.jsp](http://consultaregistro.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp)
22. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823–46.
23. Pardal P, Medeiro S, Al E. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98(1):28–42.
24. Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals* [Internet]. 2011;39(3):129–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.005>
25. Vargas M, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Gutiérrez JM, León G. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals*. 2015;43(1):37–46.
26. Krifi MN, El Ayeb M, Dellagi K. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost [Internet]. Vol. 5, *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1999. p. 128–41. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-79301999000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301999000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
27. Vázquez H, Olvera F, Alagón A, Sevcik C. Production of anti-horse antibodies induced by IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab applied repeatedly to rabbits. Effect on antivenom pharmacokinetics. *Toxicon* [Internet]. 2013;76:362–9. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.004>
28. World Health Organization WHO. Guidelines for the Management of snakebites. 2nd ed. 2017. 208 p.
29. Instituto Nacional de Salud. Accidentes ofídicos por Micrurus, Colombia, 2011, una mirada desde la salud pública. In: Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. 2012. p. 12.
30. Otero-Patiño R. Snake Bites in Colombia. Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018 [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7438-3\\_41](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7438-3_41); 2018. 3-50 p.

31. Campbell, JA; Lamar W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Two-Volume. Comstock Publishing Associates, editor. Ithaca (NY): Cornell University Press; 2004. 528 p.
32. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*. 2014;90:15–25.
33. Castri-Herrera, F. Vargas -Salinas F. Anfibios y reptiles en el departamento del valle del cauca, Colombia. *Biota Colombiana*. 2008;9(2):251–77.
34. Guerrero-Vargas J, Coral-Plaza E, Rivas-Pava M, Meneses-Mosquera A, Ayerbe-González S. Catálogo de los anfibios de la Colección de Referencia del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Universidad del Cauca; 2007. 35 p.
35. León Núñez, L. Rojas A. Informe Del Evento Accidente Ofídico Hasta El Periodo Epidemiológico XIII Colombia, 2017 [Internet]. Instituto Nacional de Salud INS. 2017. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE OFÍDICO 2017.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE_OFIDICO_2017.pdf)
36. Scovino S. Comparación del perfil proteico de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* provenientes del valle del cauca colombia (Fundación Zoológico de Cali) mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC y electrofo [Internet]. Vol. 53, Universidad El Bosque. 2017. Available from: [https://bosq.ent.sirsi.net/client/es\\_ES/default/search/results?qu=&te=&ir=Both](https://bosq.ent.sirsi.net/client/es_ES/default/search/results?qu=&te=&ir=Both)
37. Patiño AC, Pereañez JA, Gutiérrez JM, Rucavado A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Toxicon*. 2013;63:32–43.
38. Ayerbe S, Guerrero-vargas JA. Catálogo de Reptiles Museo de Historia Natural Unicauca 2007. Universida. Natural M de H, editor. Popayán; 2007. 85 p.
39. Theakston RDG, Lalloo DG. Venomous Bites and Stings. Principles and Practice of Travel Medicine: Second Edition [Internet]. 2013;26(2):415–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.006>
40. Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “Jergón”, de tres zonas geográficas del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*.

- 
- 2012;29(2):198–205.
41. Calvete JJ. Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013;75:44–62.
  42. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Estrategias y Avances en el Estudio de Toxinas de Interés para la Biomedicina. Fabiola Pa. 2015. 258 p.
  43. Sanhajariya S, Duffull SB, Isbister GK. Pharmacokinetics of Snake Venom. *Toxins*. 2018;10(73):<https://www.mdpi.com/2072-6651/10/2/73>.
  44. Niño R. Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2018. Available from: [http://bdigital.unal.edu.co/63962/1/Rosamery Niño P.52173513.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/63962/1/Rosamery%20Ni%C3%B1o.P52173513.pdf)
  45. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* [Internet]. 2009;54(7):949–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>
  46. Fernández J, Gutiérrez JM, Angulo Y, Sanz L, Juárez P, Calvete JJ, et al. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*. 2010;92(3):273–83.
  47. Lomonte B. Manual de métodos Inmunológicos [Internet]. cuarta. Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2007. 135 p. Available from: [http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9244/2007\\_Manual\\_Metodos\\_Inmunologicos\\_completo\\_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9244/2007_Manual_Metodos_Inmunologicos_completo_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  48. Alape-giron A, Sanz L, Flores-di M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ, et al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*. 2008;7:3556–71.
  49. Mora, J. Mora, R. Lomonte, B. Gutiérrez J. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(10):e318–e318.
  50. Vergara I, Castillo EY, Romero-piña ME, Torres-viquez I, Paniagua D, Boyer L V, et al. Biodistribution and Lymphatic Tracking of the Main Neurotoxin of *Micrurus fulvius* Venom by Molecular Imaging. *Toxins*. 2016;8(85).
  51. Fernández-Culma M, Pereañez JA, Núñez-Rangel V, Lomonte B. Snake venomics

- of *Bothrops punctatus*, a semi-arboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. *PeerJ*. 2014;246:1–16.
52. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 2009;54:976–87.
  53. WHO. Technical Report Series No. 1004, 2017. Anexo 5 Guidelines of the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. In: Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins [Internet]. 2017. p. 388. Available from: [https://www.who.int/bloodproducts/AntivenomGLrevWHO\\_TRS\\_1004\\_web\\_Annex\\_5.pdf](https://www.who.int/bloodproducts/AntivenomGLrevWHO_TRS_1004_web_Annex_5.pdf)
  54. Johnson M. Cuantificación de proteínas [Internet]. Obtenido de Labome: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>. 2012. p. 1–13 Revisado: 30 de enero de 2020. Available from: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>
  55. Lemus, M. Cortez L. Bioquímica General: Fundamentos y análisis de laboratorio. Universidad Técnica de Machala, editor. Utmach. 2015. 82 p.
  56. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. John. 2003. 4648 p.
  57. Lomonte B. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Inmunología General: Manual de Laboratorio [Internet]. 2007;90–9. Available from: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Lomonte - Cap13 PAGE.pdf>
  58. Universidad Nacional Autónoma de México. Técnicas Cromatográficas. Química Analítica Instrumental II. 2007. 1-123 p.
  59. Esquivel E, Leal L. Cromatografía de fase reversa. Métodos Físicoquímicos en Biotecnología. UNAM. 2004. 1-50 p.
  60. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina* [Internet]. 2006;2(3):252–6. Available from: <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>
  61. Sells PG. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. *Toxicon*. 2003;42(2):115–33.
  62. Instituto de Biotecnología UNAM. Inmunología. Universidad Nacional Autónoma de

- 
- México, editor. 2007. 60 p.
63. World Health Organization. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. World Health Organization (WHO) [Internet]. 2017;204(1):87–91. Available from: <http://www.biologie-journal.org/10.1051/jbio/2009043%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950580>
  64. Sarmiento K, Torres I, Ríos C, Salazar J, Baracaldo A, Zambrano J, et al. Comparison of Neutralization of Two Experimental Monovalent Antivenoms of Colombia ' s Bothrops asper from Different Localities. Journal of Pharmacology and Toxicology. 2019;15(1):8–15.
  65. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Neutralization of four Peruvian Bothrops sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: Preclinical assessment. Acta Tropica. 2005;93(1):85–95.
  66. Otero-patiño, R; Silva-haad, J; Barona M et al. Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. Iatreia [Internet]. 2007;20(3):244–62. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v20n3/v20n3a02.pdf>
  67. Casewell NR, Cook DAN, Wagstaff SC, Nasidi A, Durfa N, Wuster W, et al. Pre-clinical assays predict pan-African Echis viper efficacy for a species-specific antivenom. PLoS neglected tropical diseases. 2010 Oct;4(10):e851–e851.
  68. Ainsworth S, AU - Slagboom J, AU - Alomran N, AU - Pla D, AU - Alhamdi Y, AU - King SI, et al. The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. Communications Biology [Internet]. 2018;34(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0039-1>
  69. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LRC, Villalta M, et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. Toxicon [Internet]. 2010;56(6):980–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.001>
  70. Otero R, León G, Gutiérrez JM, Rojas G, Toro MF, Barona J, et al. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without  $\beta$ -propiolactone, in the treatment of Bothrops asper bites in Colombia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and

- Hygiene. 2006;100(12):1173–82.
71. Sarmiento, Karen. Rodríguez A, Quevedo-buitrago W, Hidalgo-martínez P, Díez H. Comparación de la eficacia , la seguridad y la farmacocinética de los antivenenos antiofídicos : revisión de literatura. Universitas Médica. 2020;61(1):22.
72. Seifert SA, Boyer L V. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. Annals of Emergency Medicine. 2001;37(2):189–95.
73. Gutierrez J, Leon G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for Snakebite Envenomings. Inflammation & Allergy - Drug Targets [Internet]. 2011;10(5):369–80. Available from:  
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5281&volume=10&issue=5&spage=369>
74. Davinia, Pla. Rodríguez Y, Juan C. Third Generation Antivenomics : Pushing the Limits of the In Vitro Preclinical Assessment of Antivenoms. Toxins. 2017;9(168):12.
75. Ministerio de salud y protección social. Resolución número 001209 del 2017. Ministerio de Protección Social, 001209 2017 p. 1–3.
76. Instituto de Biotecnología. Laboratorio de analisis instrumental [Internet]. Universidad Nacional de Colombia. p. 1. Available from:  
<http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/EnsayoLaboratorio.xhtml?idEnsayo=452>
77. Instituto de biotecnología. Misión-visión Grupo del Dr. Alejandro Alagón [Internet]. UNAM. p. 1. Available from:  
[http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?tipo:doc,dir:PRG.grupo,par:Geu,tit:Grupo\\_del\\_\\_Dr.\\_Enrique\\_Rudi%F1o](http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?tipo:doc,dir:PRG.grupo,par:Geu,tit:Grupo_del__Dr._Enrique_Rudi%F1o)
78. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature medicine. 1970;227:680–5.
79. INS. Producción y Venta de Antivenenos [Internet]. Minsalud. p. 1. Available from:  
<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Produccion/Paginas/Suero-antiofidico-polivalente.aspx>
80. Calderón A. Caracterización de la respueswta inmune humoral en caballos contra el veneno de *Micrurus tener*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.

- 
81. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;4(9):429–34.
  82. Neri E. Reconocimiento inmunoquímico de venenos de Viperidos norteamericanos por Antivipmyn y CroFab. Vol. 1, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2010.
  83. Benard-Valle, M. Neri-Castro, E. Fry, BG. Boyer, L. Cochran, C. Alam, M. Jackson, T.N.W. Paniagua, D. Olvera, F. Koludarov, I. Sunagar, K. Alagon A. Antivenom Research and Development- Chapter 3. In: *Venomous Reptiles and Their Toxins Pathophysiology and Biodiscovery*. 2015. p. 61–72.
  84. Otero-patiño, R; silva-haad, J; barona, M; Toro M et al. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia* [Internet]. 2002;15(1):5–15. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932002000100001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932002000100001)
  85. Mora-Obando D, Guerrero-Vargas JA, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops asper* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics*. 2014;96:159–72.
  86. Snakedatabase.org. LD50 of venomous snakes [Internet]. *Bothrops asper* - lethal doses. Available from: <http://snakedatabase.org/pages/ld50.php#backToTop>
  87. García PJ, Yarlequé A, Bonilla-ferreyra C, Pessah S, Vivas D, Sandoval GA, et al. Antiveneno Bothrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. 2008;25(4):386–91.
  88. Sánchez L V, Pla D, Herrera M, Chippaux JP, Calvete JJ, Gutiérrez JM. Evaluation of the preclinical efficacy of four antivenoms, distributed in sub-Saharan Africa, to neutralize the venom of the carpet viper, *Echis ocellatus*, from Mali, Cameroon, and Nigeria. *Toxicon*. 2015;106.
  89. Tanaka M, Suemaru K, Watanabe S, Cui R, Li B, Araki H. Comparison of short- and long-acting benzodiazepine-receptor agonists with different receptor selectivity on motor coordination and muscle relaxation following thiopental-induced anesthesia in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008;107(3):277–84.

